

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

**Caracterización estructural y funcional de
la ARN polimerasa dependiente de ARN del
virus de *Thosea asigna***

- TESIS DOCTORAL -

Diego Sebastián Ferrero
Madrid
2013

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas por:

Diego Sebastián Ferrero

Universidad Autónoma de Madrid

Julio de 2013

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre
C.N.B. – C.S.I.C.

Dra. Núria Verdaguer Massana
I.B.M.B. – C.S.I.C.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (C.N.B.-C.S.I.C.) bajo la dirección del Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre y la Dra. Nuria Verdaguer Massana. Su financiación corrió a cargo de una beca del Programa Internacional de Becas de Doctorado de la Fundación “La Caixa”.

Dos personas me han mostrado lo que hace falta en la vida: Petrona y María Elena; y otras dos me dieron las herramientas para conseguirlas: María y Carlos. A ellos les dedico este trabajo, en agradecimiento a todo lo que dieron por mí.

AGRADECIMIENTOS

Quizás sea éste uno de los textos más difíciles de escribir, porque carezco de palabras en mi vocabulario para expresar el profundo reconocimiento que le debo a cada una de las personas que han contribuido con el trabajo que culminó en esta tesis doctoral. Con más de 100.000 palabras en el castellano, solo sé decir GRACIAS.

A mis directores, el Dr. José Francisco Rodríguez y la Dra. Núria Verdaguer. Gracias por brindarme la oportunidad de cumplir con mi objetivo y por brindarme el espacio que necesitaba para dejar fluir mi vocación. Por incentivarme a continuar en este camino y por la preciada formación que me dejan, un legado que sabré aprovechar. Gracias por la confianza recibida y la contención que me brindaron.

A mis compañeros del laboratorio 117 del CNB. Los que ya no están: Nerea, Sonia, Loly e Idoia. Y a los que hasta hoy me acompañaron: Romy, Fernando, Antonio, Ana y Gema. Muchas gracias por el apoyo que me brindaron. Nerea, gracias por haberme enseñado el trabajo del laboratorio pero sobre todo por haberme llevado fuera de él para conocer Madrid. Sonia, gracias por tu consejos, tu disponibilidad y gran ayuda, dentro y fuera del CNB. Loly, por el cariño de madre que me brindaste.

Idoia, gracias por el apoyo personal y profesional que me has dado, por compartir conmigo tus logros y hacerme sentir lo maravillosa que puede ser la ciencia cuando se combina el trabajo de áreas totalmente distintas. A sido un enorme placer compartir esta etapa con vos, habiendo contado con una excelente científica a mi lado y pero por sobre todas las cosas con una gran amiga.

Romy, gracias por brindarme el compañerismo que hace que levantarse cada mañana para ir a trabajar sea un placer. Gracias por escuchar, compartir y formar parte de ese pequeño grupo de personas a las que tengo un inmenso afecto y considero mis amigos.

Fernando, gracias por ser en gran parte culpable de esto. Por haberme aconsejado y mostrado que otro camino era posible en el doctorado alentándome a tomarlo. Por tu incondicional apoyo y haber sido el detonante de un cambio tan importante.

A mi antiguos compañeros, César, Ángela y Juan. Por haberme apoyado tanto en mis inicios en el mundo de la cristalografía. Por brindarme la complicidad, la contención y la amistad que me brindaron cuando lo necesitaba.

También deseo agradecer a los chicos de Barcelona, miembros del laboratorio de la Dra. Núria Verdaguer. Quienes me han acogido y ayudado en mis numerosas estancias allí, y me han acompañado en las jornadas de trabajo en el sincrotrón. Gracias a Laia, Cristina, Pablo, Cristina Silva. Anna y Pablo del laboratorio de la Dra. Maria Solà. Mi especial

agradecimiento a Mónica, por haber compartido tantas horas (hasta la madrugada) en el laboratorio para asegurar que los proyectos salieran adelante. Gracias por todo el esfuerzo y por encargarte de bautizar las proteínas, el secreto para su cristalización.

No podría dejar de agradecer al Dr. José Ruíz Castón, “Pepe” por sus valiosos aportes y su confianza; así como también al resto de los miembros de su laboratorio. A Dani, por la dedicación y la paciencia que ha tenido para trabajar en este proyecto, y por estar siempre dispuesto a dedicarme tiempo. A Josué, Elena, Ana y Carlos, por brindarme su apoyo y amenizar con buen humor las horas que pasamos en el CNB. A Mariana, a quien no me alcanzarían las páginas de esta memoria para darle las gracias. Gracias por alentarme siempre, por darme tu apoyo incondicional, tu cariño, por hacerme ver las cosas de otra manera y ser siempre una fuente inagotable de buen humor contagioso que me ha arrancado una sonrisa cuando lo necesité. Ha sido un enorme placer compartir esta etapa con vos.

Mi agradecimiento también para las personas que han compartido conmigo gratos momentos dentro y fuera del CNB: Yani, Ceci, Laura, Susana Guerra y Susana de Lucas.

Quiero también agradecer al Centro Nacional de Biotecnología, y en especial al departamento de Biología Molecular y Celular, por cederme sus instalaciones para mi instrucción.

A la fundación la Caixa por su generoso aporte durante estos años, sin el cual no habría sido posible esta tesis.

A mi querida y gran amiga Florencia Iulita, quien pese a la distancia siempre me ha animado y aconsejado, siendo uno de mis grandes apoyos. A mis otras queridísimas amigas con las que tuve el honor de pasar mis años de universidad: María José, “Majo”; Albertina, y Flavia. Gracias por quererme tanto y estar presentes siempre que las he necesitado.

A Darío, un amigo con todas las letras de esos pocos que nos da la vida. Por alentarme y acompañarme. Por esas charlas y trabajos de compañeros biotecnólogos que nunca hemos abandonado y que tanto nos enriquecen.

A mi amigo de toda la vida, Javi “el gringo”, que cuando he necesitado momentos de esparcimiento en mis viajes a casa, me ha acompañado a disfrutar de la naturaleza y largas jornadas de pesca allí donde se nos ocurriera, como hemos hecho desde pequeños.

Por último, aunque no menos importante, quiero dar las gracias a mi familia. Aunque a la distancia, las charlas que nos hemos brindado han sido el combustible que cada mañana permitían levantarme y seguir adelante, en honor al enorme sacrificio que ha sido criarme bajo las tempestades de la vida. A mi madre, María, mi padre, Carlos, y a mi gran tesoro,

Florcita, a quien la vida trajo como mi hermana para regalarme su sonrisa y su incondicional amor. Por y para ustedes, es esta tesis.

Abreviaturas

α -XX: anticuerpo anti-XX

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

C-terminal: carboxilo terminal

DTT: ditioneitol

DV: Virus Dengue

EDTA: ácido etilendiamonotetraacético

FMDV: Virus de la fiebre aftosa

GTP: guanosina-5'-trifosfato

h.p.i.: horas post infección

h.p.t.: horas post transfección

HT: cola de histidinas (Histidine Tag)

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

M: marcador de peso molecular

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

MOI: multiplicidad de infección (Multiplicity Of Infection)

N-terminal: amino terminal

ORF: marco abierto de lectura (Open Reading Frame)

pb: par de bases

PBS: tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

RpRd: ARN polimerasa ARN dependiente

rVV: virus vacunal recombinante (recombinant Vaccinia Virus)

rBV: baculovirus recombinante (recombinant Baculo Virus)

SDS: dodecil sulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate)

SDS-PAGE: electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Tris: tri-(hidroximetil)-aminometano

UTR: región no traducida (UnTranslated Region)

WB: inmunodetección de proteínas en membrana (*Western Blot*)

SDS: dodecil sulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate)

ÍNDICE

ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Los virus	5
1.2. La estructura como herramienta de estudio evolutivo	6
1.3. Polimerasas virales	7
1.3.1. Mecanismo de catálisis de las polimerasas	9
1.3.2. Las ARN polimerasas ARN dependientes	10
1.3.3. Regulación de las ARN polimerasas	12
1.3.4. Localización de los complejos replicativos virales	14
1.4. El virus de <i>Thosea asigna</i> (TaV)	15
1.4.1. Organización genómica de TaV	16
1.4.2. Estructura y morfogénesis del virión	17
1.4.3. La ARN polimerasa de TaV	18
1.5. Relaciones estructurales y funcionales entre virus de ssARN y dsARN	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Material Biológico	27
3.1.1. Células procariotas	27
3.1.2. Células eucariotas	27
3.1.4. Plásmidos	27
3.1.5. Virus	28
3.1.5.1. Baculovirus	28
3.1.5.2. VACV	29
3.1.6. Anticuerpos	29
3.2. Obtención y manipulación de material biológico	30
3.2.1. PCR	30

3.2.2. Reacciones de restricción enzimática	30
3.2.3. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA	30
3.2.4. Generación de plásmidos recombinantes	30
3.2.4.1. Generación del plásmidos pFastBacHtb ORF1 TaV	30
3.2.4.2. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-ORF1-S4A, -ORF1-T157A, -ORF1-D351/352A, -ORF1-T443/444A, -ORF1-T508A.	31
3.2.4.3. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-ORF1-D27, -ORF1-D27D657, -ORF1-D611-617.	31
3.2.4.4. Generación de los plásmidos pVOTE-hORF1 TaV	32
3.2.4.5. Generación de los plásmidos pLEX-2.1-His y pLEX-2.1	32
3.2.4.5.1. Generación de los plásmidos pLEX-2.1-His-D1, His-D2 y His-ORF1-Flag	32
3.2.4.5.2. Generación de los plásmidos pLEX-2.1-ORF1-Flag y Δ 27-ORF1-Flag.	33
3.2.5. Obtención de Baculovirus recombinantes (rBV)	33
3.2.6. Obtención de VACV recombinantes (rVVs)	33
3.3. Infecciones, titulaciones virales y transfecciones.	34
3.3.1. Infección con rBV	34
3.3.2. Infección con rVV	34
3.3.3. Titulación de rVV	34
3.3.4. Transfecciones	34
3.4. Expresión y purificación de proteínas y ácidos nucleicos	34
3.4.1. Purificación de las proteínas con cola de histidinas	35
3.4.2. Expresión de proteínas recombinantes en infecciones con rVV	35
3.4.3. Purificación de las proteínas con cola de histidinas a partir de rVV	35
3.4.4. Transcripción <i>in vitro</i> para la generación de ARN moldes	36
3.5. Análisis Bioquímico	36
3.5.1. Marcaje metabólico con [³⁵ S]-Metionina	36
3.5.2. Análisis electroforético en geles desnaturizantes de poliacrilamida	37
3.5.3. Electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western Blot</i>)	37
3.5.4. Análisis electroforético en geles nativos de agarosa	37
3.5.5. Análisis electroforético en geles nativos de poliacrilamida	37

3.5.6. Análisis por filtración en gel	38
3.5.7. Ensayo de actividad polimerasa	38
3.5.7. Cuantificación de la radiactividad incorporada	38
3.6. Análisis estructural	38
3.6.1. Cristalografía y difracción de rayos X.	39
3.6.1.1. Cristalización de la RpRd de TaV aislada y formando complejos con metales y sustratos RNA y rNTPs	39
3.6.1.2. Recogida y procesado de datos	39
3.6.1.3. Resolución de la estructura	40
3.6.1.4. Refinado de las estructuras	40
3.6.2. Inmunofluorescencia y microscopía láser confocal	40
3.6.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	41
3.6.3.1. Procesamiento digital de imágenes y reconstrucciones 3D	41
4. RESULTADOS	44
4.1. Purificación de proteínas	47
4.1.1. Purificación del ORF1 de TaV a partir de células de insecto	47
4.1.2. Purificación a partir de células BSC40 infectadas con rVV-TaV RpRd	50
4.2. Caracterización funcional del ORF1 de TaV	51
4.2.1. Ensayo de polimerización in vitro	51
4.2.2. Estudio de las variables de reacción y cinética de polimerización	53
4.3. Análisis estructural del ORF1 de TaV	55
4.3.1. Estudio cristalográfico y difracción de rayos X del ORF1 de TaV	55
4.3.1.1. Estructura de la RpRd de TaV con átomos pesados	57
4.3.1.2. Estructura de la RpRd de TaV como apoenzima	57
4.3.1.3. Estructura de la RpRd de TaV (holoenzima) en complejo con nucleótidos	66
4.3.1.4. Estructura de la RpRd de TaV (holoenzima) en complejo con ssARN	67
4.3.1.5. Estructura de la RpRd de TaV (holoenzima) en complejo con ssARN (15nt) + NTPs	69
4.3.1.6. Comparación de las estructuras de la polimerasa aislada y en complejo con ssARN	70

4.3.2. Caracterización estructural del ORF1 de TaV por microscopía electrónica	71
4.3.2.1. Reconstrucción 3D del dominio cristalizado del ORF1 de TaV	72
4.3.2.2. Reconstrucción 3D del ORF1 de TaV con el extremo C-terminal completo	74
4.4. Microscopía confocal de fluorescencia del ORF1 de TaV expresada en células de insecto	76
4.4.1. Expresión transitoria de la RpRd de TaV	76
4.4.2. Distribución subcelular y cinética de acumulación de la RpRd de TaV en células Hi5	77
4.4.3. Localización subcelular del ORF1 de TaV	78
4.4.4. Distribución de los dominios independientes del ORF1 de TaV	81
4.4.5. Estudio por mutagénesis del dominio carboxilo terminal del ORF1 de TaV	81
4.4.6. La RpRd de TaV es activa en células de insecto	83
5. DISCUSION	87
5.1. La permutación del dominio de la palma en la RpRd de TaV no afecta a la arquitectura del centro activo ni tampoco a su función.	89
5.2. La RpRd de TaV es capaz de sintetizar ssARN <i>de novo</i> .	90
5.3. Regulación del lazo $\lambda 6$ sobre la actividad de la enzima y mecanismo de iniciación.	90
5.4. Modificación covalente y papel del motivo B de la RpRd de TaV.	93
5.5. El N-terminal de la ORF1 regula la actividad y el estado de oligomerización.	94
5.6. Localización del ORF1 de TaV <i>in vivo</i> .	96
5.7. Caracterización estructural del extremo C-terminal en la ORF1.	98
5.8. Homología estructural de la RpRd de TaV con otras polimerasas y su implicación evolutiva.	99
6. CONCLUSIONES	104
7. BIBLIOGRAFIA	109

ABSTRACT/RESUMEN EN INGLÉS

Thosea asigna virus (TaV) is an insect-restricted virus with a monosegmented positive-sense, single stranded RNA (ssRNA) genome enclosed within an icosahedral $T = 4$ capsid. TaV belongs to the recently created *Permutotetraviridae* family, which includes non-enveloped viruses with a particular organization of sequence motifs within their RNA dependent RNA polymerases (RdRp).

All polymerases are broadly conserved in viruses following a right hand architecture with fingers, palm and thumb subdomains, and also conserved six ordered sequence motifs (A-B-C-D-E-F), four of them located into the palm subdomain (A to D) and two (E-F) that are only present in RdRps. Previous sequence analyses showed that, similarly to what had been found for members of the *Birnaviridae* family, the TaV RpRd does not follow the canonical organization (C-A-B-D) of the palm subdomain. Given the rarity of these atypical polymerases, the structural and biochemical information about them is rather scarce. For this reason, we performed a comprehensive study of the RdRp of TaV.

We have solved the structure of a recombinant version of the TaV RdRp domain purified from insect cells by X-ray crystallography. The exhaustive analysis of the atomic structure allowed the identification of the conservation of the overall fold of the polymerase which shows a surprisingly high degree of similarity to its Flavivirus counterpart. We have also identified several structural elements that might play a role in the regulation of the polymerase activity, i.e. the 30 N-terminal residues and the extense loop that block the active site cavity that may act as negative regulator elements. This finding suggested that these elements may undergo a structural rearrangement, thus allowing the polymerase to be active by a *de novo* initiation mechanism as confirmed by biochemical analyses presented here. The use of mutant versions of the TaV RdRp provided insight into general mechanisms controlling RdRp activity and about the regulatory role played by their own structural elements.

In addition, electron microscopy images led to the generation of a three-dimensional reconstruction of the complete protein encoded by TaV ORF1. This provided relevant structural information concerning the C-terminal domain of the polypeptide. Results gathered by confocal microscopy analysis of a series of mutant versions of the protein expressed in insect cell indicate that the C-terminal domain of the TaV ORF protein is responsible for the formation of vesicle-like structures, and probably for its interaction with an as yet unidentified membranous compartment, within the cell cytoplasm where the viral replication machinery is located.

According to the results presented here, TaV can be related to Flaviviridae family considering the structural and functional similarity.

*"La frase mas excitante que se puede oir en ciencia,
la que anuncia nuevos descubrimientos, no es
"Eureka!" (Lo encontré!) sino: Es extraño"*

Isaac Asimov

Introducción

1.1. Los virus

A finales del siglo XIX, se creyó que las enfermedades eran propagadas por pequeñas formas de vida que se multiplicaban en un organismo enfermo para transmitirse de alguna manera a uno sano. Años más tarde se descubrió que esas partículas eran moléculas muy grandes, menores que una bacteria, confirmando su existencia en los líquidos patógenos previamente denominados “virus” (derivada de la palabra veneno en latín). Desde entonces, han existido controversias en torno a su definición, pero hoy sabemos que los virus, son entidades replicativas de metabolismo exógeno, que constan esencialmente de un material genético o genoma viral y proteínas accesorias. Hasta la actualidad se han descrito genomas virales compuestos de ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN) que pueden tener distintos intermediarios durante su replicación (Baltimore D. 1971). En todos ellos, se encuentran codificadas de una manera u otra, las proteínas estructurales y no estructurales que suelen acompañar al genoma viral.

Las proteínas estructurales, son aquellas que siempre están presentes en las partículas virales liberadas al medio extracelular, y cumplen la función de acompañar al genoma para protegerlo. Para ello se disponen espacialmente formando estructuras que aíslan el ADN o el ARN. Por ejemplo, las proteínas estructurales de los virus icosaédricos se asocian formando ese cuerpo geométrico hueco que contiene y protege al genoma.

Las proteínas no estructurales, pueden estar ausentes en la partícula viral aunque no por ello son menos importantes. Por ejemplo, las polimerasas, son proteínas de vital importancia en la biología del virus porque se encargan de copiar el genoma, pero no siempre se encuentran en el virus que es liberado al medio extracelular. Otras proteínas no estructurales se encargan de interactuar con factores del huésped o regular las distintas etapas del ciclo infectivo que esencialmente se resumen en: (i) fijación o absorción en la célula huésped, (ii) penetración en el interior celular, (iii) generación de ARN mensajeros, (iv) multiplicación del genoma, (v) síntesis de proteínas virales y (vi) liberación de nuevos viriones al medio extracelular.

El comportamiento de los virus, las relaciones entre ellos y su origen, es objeto de intenso estudio porque para entenderlos es necesario estudiar a los virus en su conjunto, es decir la virósfera (Figura 1). Esta tarea puede resultar abrumadora si se considera que existen más de 1031 especies virales que infectan a miembros de los tres dominios de la vida celular: *bacteria*, *archaea* y *eukarya*. Los virus con genoma de ARN simple cadena de polaridad positiva (+ ssARN) constituyen la tercera parte de ese universo, y entre ellos se incluyen patógenos humanos como el virus del Dengue, Hepatitis C o el coronavirus SARS.

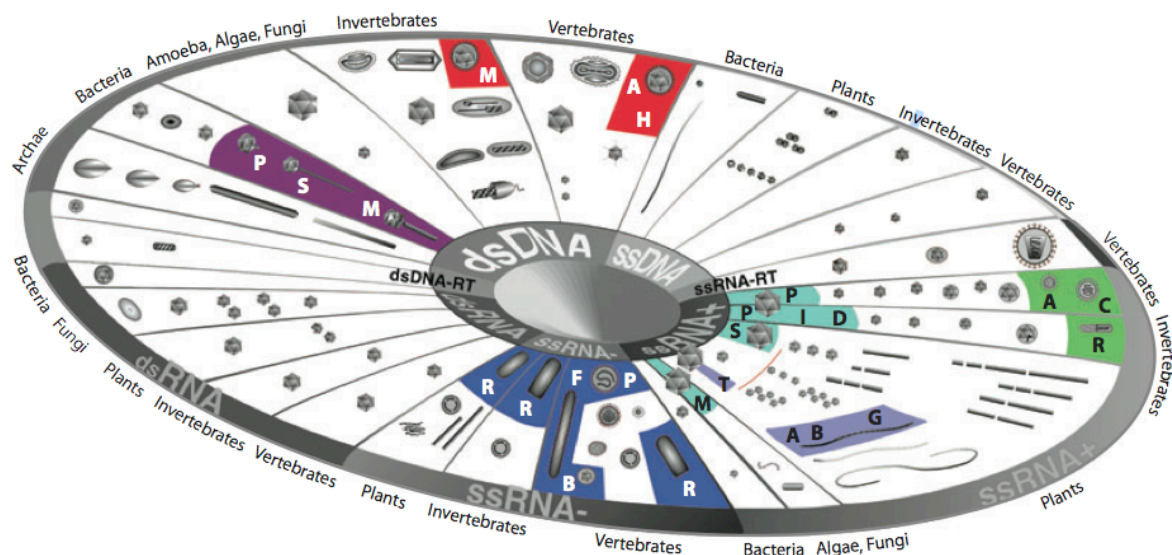


Figura 1. Virósfera. Esquema de la variedad de virus existentes en la naturaleza, agrupados en base al genoma y a la familia de organismos que infecta según la clasificación del comité internacional de taxonomía de virus (ICTV). Los colores corresponden a los órdenes de virus. Figura tomada de Abrescia y col. 2012.

Las similitudes en secuencia y organización genética, sugieren la que existencia una relación evolutiva íntima entre los virus que hoy conocemos, especialmente entre los que infectan a plantas y animales (van der Heijden y Bol 2002). En efecto, la comparación de las secuencias de las polimerasas por ejemplo, ha servido para categorizar a los virus + ssARN en tres supergrupos: I, II y III. El primero está formado por los virus similares a *Picornavirus* (en inglés, *Picorna-like virus*), el supergrupo II está compuesto por virus como *Carmo-* y *Flavivirus* (*Carmo-* y *Flavi-like virus*), mientras que el III lo forman los parecidos a *Alfavirus* (*Alpha-like virus*).

El virus cuya polimerasa se utilizará como modelo de estudio en esta tesis doctoral, fué incluida inicialmente en este último supergrupo al que pertenecen la mayoría de los virus que infectan a más del 80% de las especies conocidas sobre el planeta, los insectos. La cantidad de especies de insectos supera al resto de todas las especies de eucariotas juntas (Rossmann y Tao 1999). De allí la relevancia de su estudio. Además existen evidencias de las similitudes entre virus de insectos y mamíferos, que posiblemente han perdurado a lo largo de la evolución (Rossmann y Tao 1999).

1.2. La estructura como herramienta de estudio evolutivo

Es difícil pensar que se puede comprender la diversidad del mundo viral por lo inmenso de su variedad genómica. No obstante, Abrescia y colaboradores (Abrescia y col. 2012) proponen que a pesar de la variedad genética virus y los métodos diseñados para su clasificación, la estructura de las proteínas de un virus puede usarse como herramienta para

la clasificación de los virus en taxones superiores (e.g. familia, orden) en donde las similitudes genómicas no son observables.

Basados en la propuesta de W. Astbury (Astbury 1953) de que existe un número finito de maneras en que una proteína puede plegarse dando lugar a familias de plegamientos, es posible reducir el análisis comparativo. Por ello, el abordaje estructural de la clasificación de virus, reduce la complejidad del estudio de un gran número de secuencias genómicas a un espacio de menor variabilidad como es el de los plegamientos de las proteínas.

Esa estrategia permite inferir relaciones evolutivas más antiguas que las detectadas cuando se emplean métodos basados en la comparación de secuencias, muy eficaces para el estudio de virus cercanos evolutivamente dado que el requerimiento de mantener una función implica la imposición de restricciones en la estructura en la estructura proteica.

Esta estrategia se ha aplicado al estudio de proteínas de la cápsida, en donde los análisis estructurales comparativos entre diferentes arquitecturas virales han demostrado la existencia de similitudes en el plegamiento de las proteínas de virus que infectan a huéspedes en los tres órdenes de la vida.

Debido a la conservación de función y su vital importancia, las polimerasas son una alternativa de estudio para la clasificación viral, que puede ayudar a comprender las complejas relaciones evolutivas en la virósfera.

1.3. Polimerasas virales

Las polinucleótido polimerasas (PNP) son las enzimas encargadas de copiar el genoma viral para asegurar su utilización y conservación a lo largo de las generaciones. Para ello, el ácido nucleico genómico (ADN o ARN) es utilizado como un molde sobre el cual las polimerasas añaden nucleótidos de acuerdo a la complementariedad de bases nucleotídicas (Watson y Crik, 1953), y catalizan su unión covalente para formar una cadena equivalente a la molde. Esta reacción se inicia en presencia de una proteína cebador, denominada VPg (Paul 2002; Ferrer-Orta y col., 2006; Ferrer-Orta y col. 2009; Goodfellow 2011), o un oligonucleótido, en el caso de las PNP dependientes de cebador. En algunas polimerasas la reacción también puede iniciarse por un mecanismo independiente de cebador (van Dijk y col. 2004; Choi y Rossmann 2009).

Dada la diversidad de genomas virales plasmada en la clasificación de Baltimore (Baltimore 1971), existen diferentes polimerasas según la especificidad por los nucleótidos que unen y el tipo de molde que emplean: ADN polimerasas ADN dependientes (DpDd), ARN polimerasas ADN dependientes (RpDd), ADN polimerasas ARN dependientes (DpRd o transcriptasas reversas, RT) y ARN polimerasas ARN dependientes (RpRd). Las enzimas

que utilizan como molde ARN o ADN para sintetizar ARN pueden producir además, transcritos de los genomas en ARN mensajeros (ARNm).

A pesar de la clasificación diferencial de estas enzimas, todas las polimerasas comparten una estructura que recuerda a una mano derecha (Ollis y col. 1985), en donde pueden identificarse subdominios que corresponden a los dedos, pulgar y palma alrededor del sitio activo que cataliza la unión covalente de los nucleótidos (Figura 2). Esta extensa conservación estructural y funcional sugiere que el dominio de la palma pudo haber evolucionado de un ancestro en común (Gorbalenya y col. 2002).

Además del dominio RpRd, algunos virus presentan dominios adicionales importantes en la replicación. Por ejemplo, en miembros del supergrupo III de alfavirus, poseen un dominio metil transferasa (Rozanov y col. 1992), que se encarga de proteger el extremo 5' de los ARN genómicos y subgenómicos mediante la unión de 7-metilguanosina. Además, en algunos virus, el dominio helicasa (van der Heijden y col. 2002) que se encarga de separar ácidos nucleicos de doble cadena mediante el consumo de energía, también se encuentra conservado.

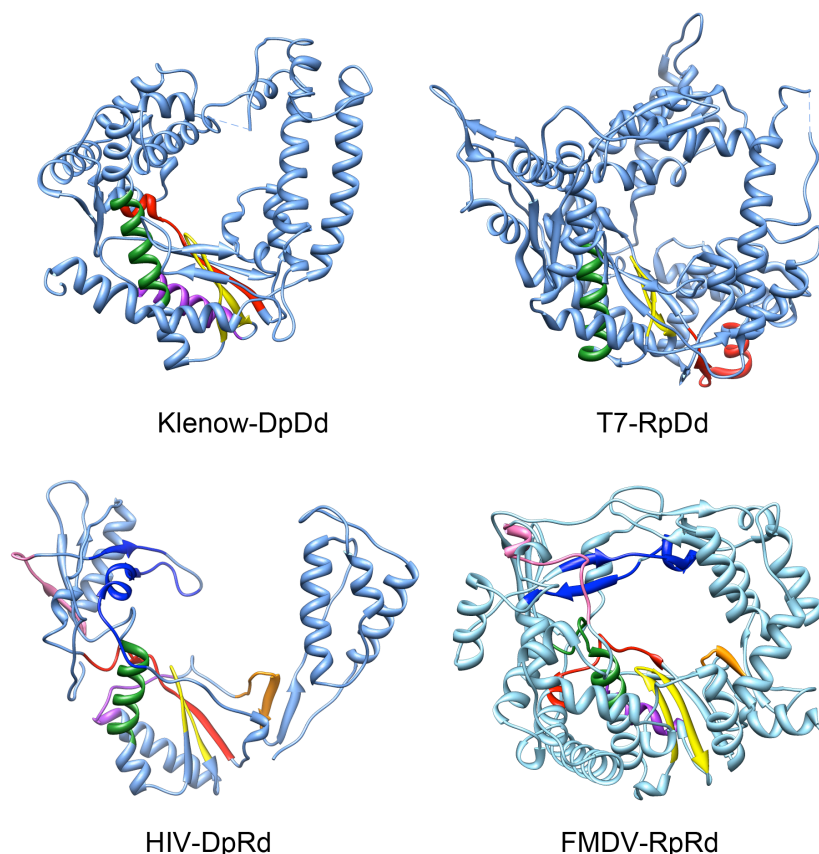


Figura 2. Estructuras representativas de las diferentes clases de polimerasas. Conservación de la forma de mano derecha en el fragmento Klenow de la ADN polimerasa ADN dependiente; la ARN polimerasa ADN dependiente del bacteriófago T7; la transcriptasa reversa del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y la ARN polimerasa ARN dependiente del picornavirus causante de la fiebre aftosa (FMDV) destacada en un tono más claro. Los motivos de secuencia se indican con los siguientes colores: A, rojo; B, verde; C, amarillo; D, violeta; E, naranja; D, rosa. Figura adaptada de Hansen y col., 1997, teniendo en cuenta la ubicación de los motivos propuesta por Lang y col. 2013.

1.3.1. Mecanismo de catálisis de las polimerasas

La adición de nucleótidos a cadenas nucleotídicas formadas que catalizan las polimerasas consiste en la transferencia de un grupo fosfato. Esta reacción sucede por medio de un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo 3' del azúcar del último nucleótido de la cadena sobre el fosfato α de un nucleótido trifosfato (NTP). Para llevar a cabo esta reacción, la polimerasas emplean un mecanismo común en todas ellas que implica el uso de dos iones divalentes (Steitz 1993) para la transferencia nucleotídica, por ello se conoce como “mecanismo de los dos iones” (Figura 3).

En el sitio activo de todas las polimerasas, existen residuos de ácido aspártico muy conservados sobre los cuales se sitúan un par de iones divalentes (A y B) que son responsables directos de la reacción. Esta catálisis solo es posible si los elementos implicados se encuentran en la posición adecuada, lo que solo ocurre cuando existe un apareamiento correcto de Watson-Crick entre el nucleótido entrante y el correspondiente en la cadena de ácido nucleico molde (Brautigam 1998).

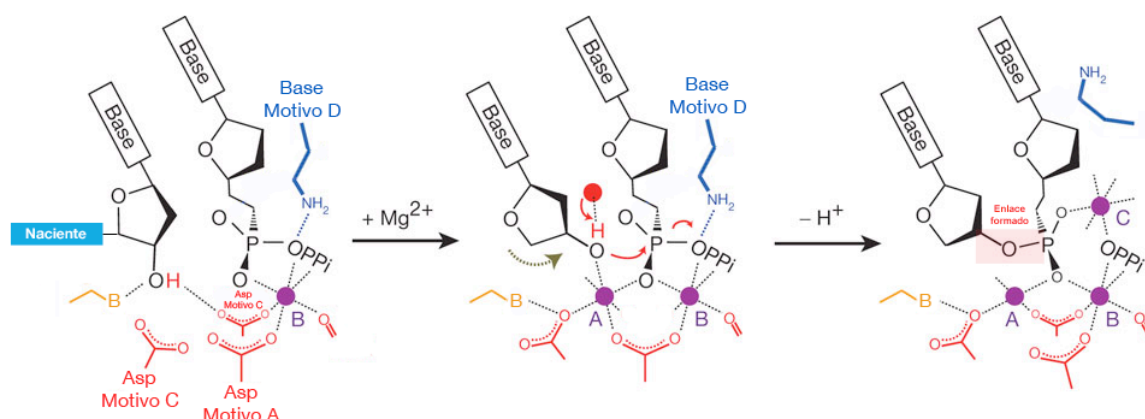


Figura 3. Mecanismo actualizado de la formación del enlace covalente entre NTPs mediado por las polimerasas. El mecanismo de catálisis implica la entrada del NTP que trae el ión B (violeta) y se asocia a la proteína a través de los residuos aspárticos del motivo A y C. La unión subsiguiente del ión A (violeta) dispone los sustratos de la reacción de la manera óptima, en particular el OH 3' del último nucleótido de la cadena naciente del ácido nucleico. El ión A predispone además la desprotonación del OH 3' que es asistida por el NTP entrante y una molécula de agua transitoria (en rojo). La transferencia de electrones resultante produce la formación de un enlace covalente entre los dos nucleótidos y la liberación de pirofosfato (PP_i) que es estabilizado por un residuo básico del motivo D (en el caso de las RpRds). Luego de iniciada la reacción y antes de la liberación de los productos, un tercer ión (C) reemplaza a la base del motivo D para estabilizar al intermediario de reacción. Los puentes de hidrógeno y coordinaciones de metales se indican como líneas punteadas. En amarillo se indica un residuo que funciona como base (B) interaccionando con el OH 3' del último nucleótido en la cadena de ácido nucleico.

Según el mecanismo de los dos iones, el catión divalente B es aportado por el nucleótido trifosfato que entra en el sitio activo coordinado por los fosfatos β y γ del

nucleótido (Figura 3). Cuando el nucleótido se ha ubicado, el segundo catión divalente (A) es coordinado por el 3'-OH de la cadena nucleotídica en crecimiento, el fosfato α del NTP y por los residuos ácidos del centro activo (Gorbalenya y col. 2002). Esta última interacción, disminuye el pK_a del 3'-OH promoviendo su desprotonación a pH fisiológico, propiciando un ataque nucleofílico al fosfato α del NTP entrante para formar un enlace covalente y liberando pirofosfato (Figura 3). Como consecuencia de la liberación del pirofosfato también se libera el catión B y el ácido nucleico se mueve dejando el 3'-OH del nucleótido recién incorporado en la posición correcta para que ocurra otro ciclo catalítico (Brautigam 1998). Recientemente se ha demostrado en la estructura de la ADN polimerasa η (Nakamura y col. 2012), que el aceptor del protón liberado es una molécula de agua (que interacciona brevemente con el 3'-OH del ADN y el O4' del dNTP entrante. Esta observación, sugiere que es el propio nucleótido quien facilita su incorporación activando el 3'-OH del cebador. Además, en este trabajo se describe también la presencia de un tercer ión (C) que estabilizaría los intermediarios de la reacción (Figura 3). Estos resultados implican cambios significativos al modelo de dos iones inicialmente propuesto por Steitz.

Por otro lado, en el año 2007, Castro y colaboradores observaron que durante la reacción de incorporación de nucleótidos podían transferirse dos protones y no solo uno (Castro y col. 2007). El segundo protón era transferido al pirofosfato, aumentando de 50 a 1000 veces la velocidad de la reacción. En trabajos posteriores, estos autores han publicado una extensión del mecanismo de los dos iones, en donde demuestran que un residuo básico del motivo D que está conservado en todas las RpRds y RTs, es el donador del segundo protón y que los cambios conformacionales en el motivo D y en particular, en la posición de este amino ácido, son los determinantes tanto de la eficiencia como de la fidelidad de incorporación de nucleótido (Castro y col 2009; Yang y col 2012; Verdaguer y Ferrer-Orta 2012). Lo que implica que un aminoácido del sitio activo regula y participa directamente sobre la catálisis.

1.3.2. ARN Polimerasas ARN dependientes

Los virus que poseen un genoma de ARN pueden englobarse en tres grupos: i) virus ARN doble cadena (ARNds), ii) virus ARN de simple cadena y de polaridad positiva (+ ARNss) y iii) virus ARN de simple cadena y polaridad negativa (- ARNss). Todos ellos codifican para una ARN polimerasa dependiente de ARN (RpRd) responsable de la replicación y transcripción de sus genomas (Kooning 1993; Ahlquist 2002).

El análisis detallado de las estructuras de las RpRd resueltas hasta ahora, muestra que existen importantes similitudes entre ellas a pesar de su escasa identidad en secuencia (Lang y col. 2013; Bruenn 2003)

La conformación de mano derecha cerrada típica de las RpRd, es el resultado de la interacción de los subdominios de los dedos y el pulgar, lo que produce que el sitio activo de las RpRd se encuentre totalmente encerrado. En las demás polimerasas, sucede lo opuesto ya que la conformación de las que presentan es en forma de “U” o mano derecha abierta (Figura 2).

Otra característica común de las RpRd es la presencia de dos túneles que confluyen en la cavidad central de la polimerasa donde se localiza el centro activo (Figura 4). El primer túnel se localiza en la parte trasera de la enzima, está cargado positivamente y sirve como canal de entrada para los sustratos rNTP que debido a su carga negativa, interaccionarían de manera secuencial con los residuos básicos del túnel avanzando hasta el sitio activo (Bressanelli y col. 2002; Butcher y col. 2001; Ferrer-Orta y col. 2006).

El segundo túnel baja desde el subdominio de los dedos a la cavidad central. Este canal es moderadamente rico en residuos básicos que sirven para unir el ARN molde como se ha podido comprobar en las estructuras cristalográficas de complejos RpRd-ARN resueltas (Ferrer-Orta y col. 2006; Ferrer-Orta y col. 2009; Gong y Peersen 2010; Gong y col. 2013).

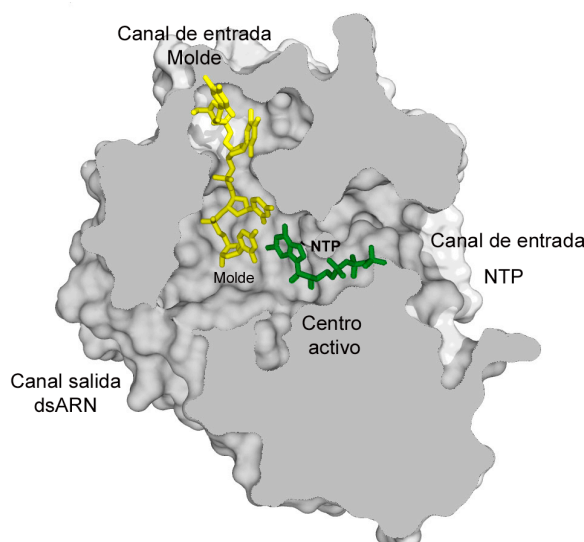


Figura 4. Canales en las RpRds. Corte lateral de la superficie de la RpRd de FMDV (pdb 2E9R) en donde se detallan los canales para la entrada de los sustratos de la reacción a la cavidad del sitio activo y el túnel para la salida del dsARN producido en la polimerización.

En las RpRd se han definido 7 motivos estructurales conservados (nombrados de A a G; Figura 2). Los 4 primeros (A-D) son comunes a otros tipos de polimerasas (Poch y col.

1989) mientras que los tres últimos (E-G) son específicos de las RpRd (Gorbalenya y col. 2002).

En el subdominio de la palma, compuesto por 4 hebras β antiparalelas que forman una lámina, se encuentran 5 de los 7 motivos ordenados secuencialmente (A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E). La presencia del sitio activo en esta región de la proteína la convierte en una zona estrictamente conservada (Delarue y col. 1990). Entre ellos, el motivo A que en las RpRd contiene la secuencia AspX₄₋₅Asp, provee uno de los Asp esenciales para la unión del catión A en el mecanismo de dos iones. Este residuo contribuye además a la especificidad RdRP seleccionando los rNTPs en lugar de los dNTPs (Gohara y col. 2002)

El motivo B, comprende una α -hélice y un pequeño lazo situado en el extremo aminoterminal de la misma (lazo-B), conservados en todas las RpRds (Gorbalenya y col. 2002). La α -hélice, posee un residuo Asn que, junto al residuo Asp del motivo A, contribuye a la especificidad por los rNTPs (Gohara y col. 2000). El lazo-B también posee varios residuos altamente conservados, Gly, Thr, Ser, que juegan un papel importante en la unión del ARN molde, concretamente en el posicionamiento del nucleótido (t+1) (Garriga y col. 2013)

El motivo C, que en la mayoría de las RpRd contiene la secuencia de aminoácidos Gly-Asp-Asp (Koonin y col. 1991), aporta los dos residuos ácidos indispensables para la unión de los iones divalentes catalíticos (A y B).

El motivo D, cuya función se encontraba asociada al andamiaje del dominio de la palma, posee un aminoácido básico conservado (Castro y col. 2009) que está directamente relacionado con la velocidad de catálisis (Moustafa y col. 2011) y fidelidad en la incorporación de nucleótidos (Yang y col. 2012; Verdaguer y col. 2012).

El motivo E, hallado en todas las RpRds -cebador dependiente e independientes- (Beerens y col. 2007) está implicado en el posicionamiento de la cadena iniciadora (Bressanelli y col. 2002; Ferron y col. 2005).

Finalmente, el motivo F está involucrado en la unión de los rNTPs, (al igual que el D) y la entrada de la cadena molde al igual que el motivo G (Gorbalenya y col. 2002), característico de las RpRds cebador dependientes (Gorbalenya y col. 2002).

1.3.3. Regulación de las ARN polimerasas

La actividad de una ARN polimerasa es susceptible a cambios en los factores externos que son necesarios en las distintas etapas de la polimerización (e.g. disponibilidad de nucleótidos, de cebador, de iones) y a las alteraciones en sus estructuras.

Una de las etapas determinantes de la polimerización y susceptible a regulación es la iniciación. Las polimerasas pueden iniciar su actividad de dos maneras (van Dijk y col. 2004; Ferrer-Orta y col. 2006): (i) *de novo* y (ii) dependiente de un cebador. En la iniciación *de novo*, un nucleótido provee el OH 3' para la adición del siguiente, no requiriendo de una enzima accesoria para la formación del cebador. En algunos casos esta polimerización es abortada a los pocos nucleótidos y el corto oligonucleótido generado se emplea como cebador sobre el extremo del ARN (van Dijk A y col. 2004) (Figura 5). También es posible una variación del mecanismo de iniciación *de novo*, conocido como de “iniciación y realineamiento”. Este mecanismo se inicia con la síntesis *de novo* de unos pocos nucleótidos, que se desprenden y vuelven a unirse al molde con un desplazamiento hacia el extremo 3'. Este mecanismo iniciador explica la existencia de una gaunina en el extremo 5' de los genomas, la que permite que la iniciación *de novo* tenga lugar en un nucleótido interno, evitando la pérdida de información genéticas en las rondas de replicación.

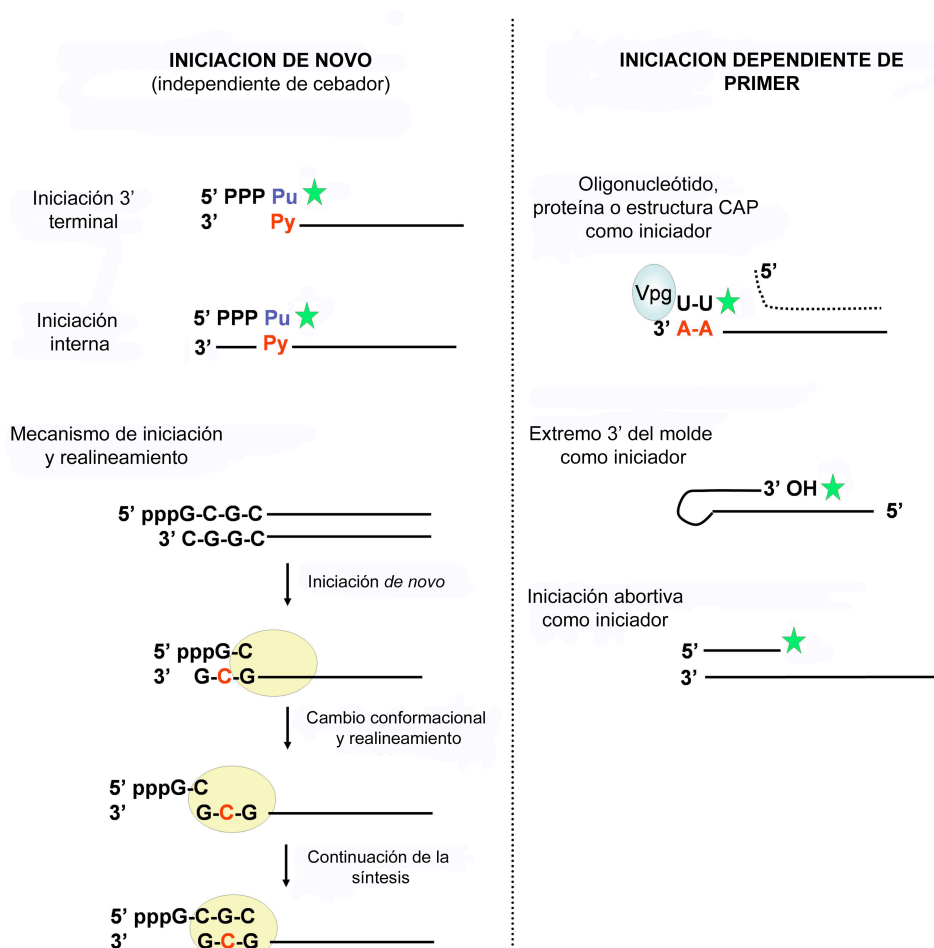


Figura 5. Esquema de los diferentes mecanismos de iniciación de la polimerización de las RpRds virales.

Las polimerasas cebador dependientes pueden requerir la presencia de un cebador de ácido nucleico u otra proteína (VPg, del inglés *Viral Protein Genome-linked*) que funcione como tal para que la enzima inicie la polimerización, por lo tanto la disponibilidad y la correcta interacción de estos elementos con la polimerasa, son determinantes de su actividad.

Las interacciones no covalentes y modificaciones covalentes en las ARN polimerasas que repercuten sobre su estructura pueden activar, inhibir o modular su actividad. Por ejemplo, la conformación activa de una RpRd puede favorecerse por su interacción con otras proteínas virales (Garriga y col. 2007; Mahias y col. 2010). Incluso la interacción entre los monómeros de la polimerasa que determina su estado de oligomerización, puede regular su actividad *in vivo* (Dye y col. 2005) o *in vitro* (Högbom y col. 2009).

La interacción de moléculas pequeñas con la cavidad donde se aloja el sitio activo de estas enzimas o incluso en zonas distantes, pueden producir alteraciones en el compacto plegamiento de este dominio. Traduciéndose en una modificación de la actividad polimerasa. Por ejemplo, los lípidos pueden afectar la actividad de la enzima (Kapadia y col. 2005) siendo incluso indispensables en algún caso (Wu y col. 1992). Incluso la unión de iones no catalíticos próximos al sitio activo pueden facilitar desplazamientos en la estructura que regulen la actividad polimerasa (Poranen y col. 2008; Wright y col. 2012). También, como otras enzimas, algunas polimerasas están sometidas a la regulación alostérica de sus sustratos para dirigir las etapas del ciclo viral (Olson y col. 2010). Este mecanismo de regulación es aprovechado en el diseño racional de inhibidores para combatir la replicación viral (Koch y col. 2006; Niyomrattanakit y col. 2010; Garriga y col. 2013).

Las modificaciones covalentes de la proteína también pueden alterar la actividad polimerasa por bloqueo de un aminoácido esencial o por el consecuente cambio estructural asociado a la modificación. La fosforilación de las RdRp es el ejemplo más extendido de modificación covalente en las polimerasas, pudiendo activar o reprimir su actividad (Jakubiec y col. 2006; Kim y col. 2009; Eden y col. 2011).

1.3.4. Localización de los complejos replicativos virales

La mayoría de los virus con genoma de ARN simple cadena modifican las membranas intracelulares formando invaginaciones pseudo esféricas o vesículas esféricas (Rust y col. 2001; Schwartz y col. 2002). Estas modificaciones permiten generar un microambiente en donde traducir, procesar sus proteínas y producir el ARN viral (Ahlgquist y col. 2003; Denison 2008). Los sitios que contienen membranas, el ARN viral, la ARN polimerasa y otras

proteínas esenciales para la replicación se denominan sus **complejos replicativos** (Denison 2008).

Los complejos replicativos virales suelen ensamblarse en diferentes membranas intracelulares, pero cada virus posee un tropismo hacia un tipo específico. Por ejemplo, los *alfavirus* usan las membranas de endosomas y lisosomas (Kaariainen y col. 2002), el virus del mosaico del bromo (BMV) emplea las membranas del retículo endoplasmático (RE) (Restrepo-Hartwig y col. 1996), los nodavirus se encuentran asociados a membranas mitocondriales (Miller y col. 2001; Guo y col. 2004). El complejo replicativo del virus de la Polio y otros enterovirus se encuentra formando vesículas compactas relacionadas con el transporte de sustancias del RE (Rust y col. 2001). La replicación del virus de la hepatitis C también se encuentra asociada a vesículas del transporte celular (Miyanari y col. 2007).

La ubicación preferencial de las polimerasas en los complejos replicativos puede responder a aprovechar la compartimentalización o concentración de factores requeridos para la actividad de la enzima (pH, concentración de iones divalentes, etc.) hallados en compartimientos celulares específicos. Esta localización ayuda además a proteger los intermediarios de dsARN frente a la respuesta celular inducida por la presencia de ARN exógeno (Ahlquist y col. 2003). Otra de las razones para la asociación de los complejos replicativos a membranas es la obtención de soporte físico para la proteína, el ARN viral (Ahlquist y col. 2003) o el aprovisionamiento de lípidos específicos que modulan la actividad de la polimerasa (Lee y col. 2006).

1.4. Virus de *Thosea asigna* (TaV)

En el año 1978 C. Reingnanum y colaboradores aislaron y caracterizaron un nuevo virus de insecto (Reingnanum y col. 1978) a partir de larvas del lepidóptero *Setothosea asigna* (familia *Limacodidae*), una plaga desfoliadora de palmeras de aceite y coco en Malasia y Borneo (Entwistle 1987) que causa pérdidas económicas para esa región. A ese virus con genoma de ARN lo denominaron virus de *Thosea asigna* (TaV) y basados en análisis físicos y serológicos (Reinganum y col. 1978; Pringle y col. 1999) lo clasificaron como miembro de la familia *Tetraviridae* por su similitud con *Nudaurelia* β virus (Tripcone y 1970; Reinganum y col. 1978; Pringle y col. 1999).

La familia *Tetraviridae* estaba formada por virus con genoma de ARN simple cadena (ssARN) de polaridad positiva encerrado en una cápsida carente de envuelta lipídica icosaédrica que posee una simetría T=4 característica de este taxón (Hendry y col. 1995). No obstante, la existencia de grandes diferencias entre los miembros de la familia

Tetraviridae (e.g. organización genómica, secuencia de la replicasa, estrategia de expresión y maduración de la cápside) a conducido a reorganizar y dividir este taxón en tres nuevas familias: (i) *Alphatetraviridae*, (ii) *Carmotetraviridae* y (iii) *Permutotetraviridae* (ICTV, Virus Taxonomy, 2011).

La familia *Alphatetraviridae* está compuesta por los géneros *Betatetravirus* y *Omegatetravirus*. Las principales diferencias entre éstos dos son la organización genómica monopartita y bipartita respectivamente y la apariencia del virión (Pringle y col. 2001; Zeddám y col. 2010).

Por otra parte, la familia *Carmotetraviridae* únicamente contiene el género: *Carmotetravirus* para el cual existe solo una especie descrita y ampliamente estudiada: el virus de la Providencia (PrV) .

Por último, la familia *Permutotetraviridae* contiene el único género *Permutotetravirus*, que agrupa dos especies de virus, *Euprosteria elaeasa* (EaV) (Zeddám y col. 2010) y al TaV.

1.4.1. Organización Genómica de TaV

El genoma de TaV está formado por una cadena de ARN simple de polaridad positiva de 6.5 kb de longitud y una molécula de ARN subgenómica de 2.5 kb (Pringle y col. 1999). Los extremos del genoma contienen las regiones no traducibles (UTR) 5' y 3' de 84 nt y 140 nt respectivamente. Ambos se encuentran desprovistos de estructuras como la 7-metil-guanosina en el extremo 5' o una secuencia de poli(A) en el extremo 3' presentes en otros genomas virales. Los UTRs de TaV poseen estructuras secundarias diferentes. Según el análisis bioinformático (MFOLD) el UTR 5' se halla formando un asa -16.6 kcal/mol mientras que el UTR 3' posee una estructura secundaria similar a un pseudo nudo de -26.10 kcal/mol, conservada en otro miembro de la familia *Permutotetraviridae* (Zeddám y col. 2010). Estas estructuras están comúnmente implicadas en la regulación de la replicación viral (Brierley y col. 2007).

La molécula de ARN genómico contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs) parcialmente solapados (Pringle y col. 1999) en 626 nt y desplazados +1 nt (Figura 6). El ORF 1 (3.7 kb) codifica una proteína de 140 kDa que contiene un dominio RpRd y que no había sido caracterizada bioquímicamente hasta el momento. El ORF 2 (2.3 kb), ubicado en el extremo 3' del genoma codifica para una poliproteína que es procesada para dar lugar a tres proteínas. Una de ellas es de 17 kDa (p17) no detectada en viriones maduros (Pringle y col. 1999) ni requerida para el ensamblaje de VLPs cuya función es desconocida. Las dos

proteínas restantes, una de 58,3 kDa (L) y otra de 6,8 kDa (S) forman la cápside viral (Pringle y col. 2001).

La molécula de ARN subgenómico presente en el virión solo contiene un ORF que es la copia exacta del ORF2 contenido en el segmento de ARN genómico.

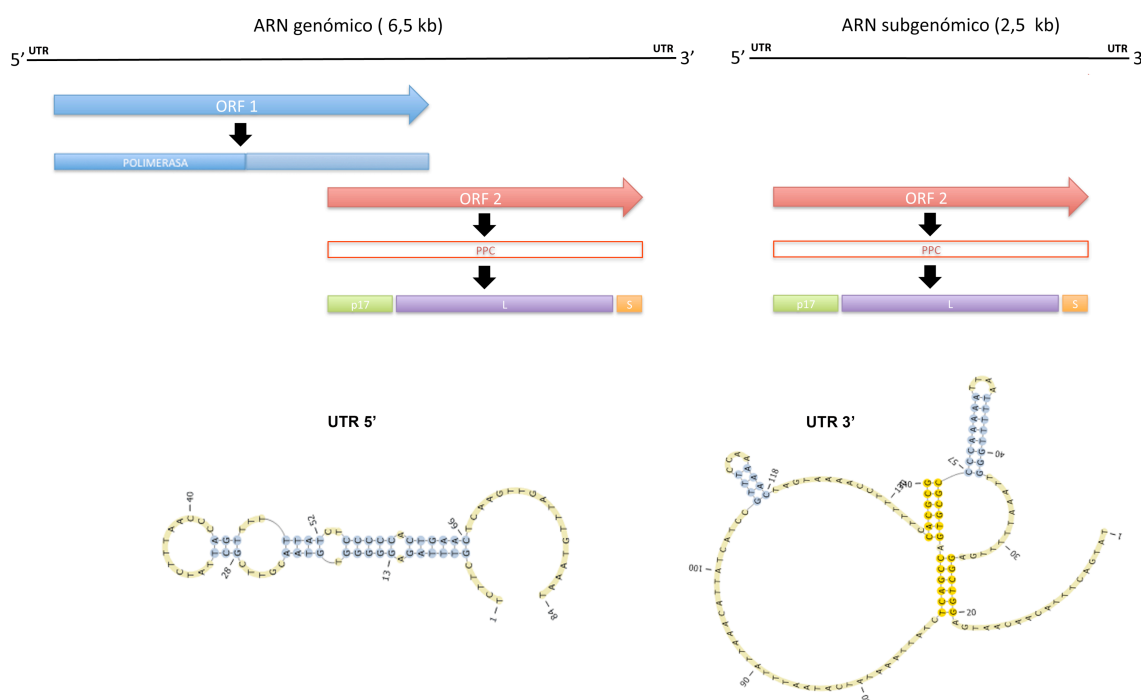


Figura 6. Organización genómica del TaV. Esquema de los segmentos de ARN genómico y subgenómico y los ORFs contenidos que dan lugar a la polimerasa, y la proteína precursora de la cápside (PPC). Tras el procesamiento proteolítico de este precursor se obtiene la proteína no estructural p17 (17 kDa), y las dos proteínas estructurales L (58.3 kDa) y S (6.8 kDa). B) Estructura secundaria de los UTRs del genoma de TaV.

1.4.2. Estructura y Morfogénesis del virión

El material genético se encuentra protegido por la partícula viral, formada por una cápside de 38 nm de diámetro (Reinganum y col. 1978; Pringle y col. 1999) que es ingerida por la larva de *Thosea asigna* que alberga la replicación viral en los tejidos del intestino medio. El virión de TaV tiene un densidad de flotación en CsCl de 1,296 g/cm³ (Pringle y col. 1999), similar a la observada con otros tetravirus (Reinganum 1978; Hendry y Agrawal 1994), un coeficiente de sedimentación de 194 (S20w) y un contenido de RNA 10,2% del RNA.

La cápsida icosaédrica del TaV está formada por 240 subunidades de las proteínas estructurales L y S, ambas obtenidas por el procesamiento proteolítico de una proteína precursora (Pringle y col. 2001). El mecanismo de maduración y procesamiento de las

proteínas de la cápside ha sido descrito como novedoso entre los virus de + ssARN (Pringle y col. 1999; 2001), en el que está involucrada una secuencia proteica autocatalítica similar a la empleada por FMDV (Martin y col. 1991; Donnelly y col. 2001). Eso implicaría que la proteína es cortada de forma co-traducciona mediante el mecanismo de cambio de fase de lectura (*frame shifting*). Recientemente se ha demostrado la capacidad de esta secuencia de funcionar en distintos sistemas (Szymczak y col. 2004; Osborn y col. 2005).

1.4.3. La ARN polimerasa de TaV

En la RpRd de TaV, el motivo C se ubica por delante del motivo A en la estructura primaria de la proteína. Esta permutación en la secuencia produce una estructura del subdominio de la palma en donde los elementos estructurales no tienen una conectividad canónica (C-A-B-D-E) como en el resto de las polimerasas virales (A-B-C-D-E). Esta restructuración de los motivos aun manteniendo la arquitectura de “mano derecha”, convierte a esta enzima en una RpRd estructuralmente única.

1.5. Relaciones estructurales y funcionales de virus ssARN y dsARN.

La existencia de similitudes estructurales y funcionales existentes entre *birnavirus* y los virus + ssRNA, como son la posesión de un genoma bisegmentado (Fauquet 2005) y la maduración proteolítica de la proteína de la cápside, han llamado la atención de aquellos que apuntan a entender las relaciones evolutivas entre virus tan distantes.

La primera evidencia de ello ha sido la proteína VP2 de los birnavirus representa un híbrido estructural entre la proteína de la cápside de virus ssRNA y dsRNA (Coulibaly y col. 2005; Ahlquist 2005).

El análisis de secuencia de las polimerasas de birnavirus (Gorbalenya y col. 2002) y la posterior resolución de las estructuras de las RpRds del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) (Pan y col. 2007; Garriga y col. 2007) y el de la necrosis pancreática (IPNV) (Graham y col. 2011), determinaron que ambas enzimas pertenecen a un grupo de polimerasas no canónicas. Estas se definen, como se describió anteriormente, por la permutación en los motivos del dominio de la palma que no se ha encontrado en otros virus dsARN.

Por otra parte, solo en unos pocos casos de virus con genoma de + ssARN, se ha descrito la misma permutación en un sitio tan trascendente de la proteína. Estos son: el virus de la vid Q (Sabanadzovic y col. 2009) el virus de *Euprosterna elaeasa* y el virus de *Thosea asigna* (Gorbalenya y col. 2002; Zeddami y col. 2010) siendo estos últimos patógenos restringidos exclusivamente a insectos.

En base a estudios de secuencias de replicasas (Gorbalenya y col. 2002) se sugirió que las ARN polimerasas primigenias podrían haber presentado una organización no canónica en sus dominios de la palma y que las polimerasas canónicas habrían evolucionado a partir de éstas. Desde este punto de vista se ha considerado a las RpRd de los birnavirus y permutotetravirus como vestigios evolutivos del proceso y que existe una relación entre ellos.

Para contribuir a la discusión sobre los vínculos entre virus distanciados en la evolución y generalizar los mecanismos de replicación viral, esta tesis se ha centrado en la caracterización estructural y bioquímica de una RpRd hipotéticamente ancestral como la del permutotetravirus TaV.

"Lo que importa verdaderamente en la vida no son los objetivos que nos marcamos, sino los caminos que seguimos para lograrlo."

Percy B. Shelley

Objetivos

Objetivos

Con el fin de profundizar en los mecanismos de regulación de la maquinaria de replicación de los genomas virales se abordó la caracterización estructural y funcional de la ARN polimerasa dependiente de ARN, RpRd, de TaV codificada en el ORF1 del genoma viral.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Producción y purificación de la proteína del ORF 1 de TaV recombinante.
- Analizar estructuralmente la proteína ORF1 de TaV que comprende el dominio RpRd, mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Realizar un estudio bioquímico de la proteína purificada y caracterizar su actividad RpRd *in vitro*.
- Estudiar la RpRd de TaV en el contexto intracelular por medio de microscopía confocal de fluorescencia en cultivos de células de insecto.

"Quien se dedica a investigar está obligado a que sus principios copien fielmente a la Naturaleza; tiene que apresar determinados aspectos complejos de lo experimental para poder expresarlos rigurosamente"

Albert Einstein

Materiales y Métodos

3.1. Material Biológico

3.1.1. Células procariotas

La cepa *E. coli* DH5a (Raleigh y col. 2002) se utilizó para la amplificación de plásmidos recombinantes. La cepa de *E. coli* DH10Bac (Luckow y col. 1993) se utilizó para la generación de bácmidos recombinantes.

3.1.2. Células eucariotas

Para la generación, amplificación y expresión de baculovirus recombinantes (rBV) se utilizó la línea celular *High Five*TM (H5) (BTI-TN-5B1-4) (*Invitrogen*), un clon de células aislado de *Trichoplusia ni* (oruga del repollo). Para la obtención, crecimiento y expresión de genes insertados en el genoma de virus vacunales (VACV) recombinantes, se utilizaron células BSC-40 (ATCC, CRL-2761), células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano) derivadas de la línea BSC-1 (ATCC, CCL-26). Para la obtención y crecimiento de VACV recombinantes (rVV) se utilizaron las mismas células.

Las células H5 se cultivaron en medio TC-100 (*GIBCO*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y fungizona (1 µg/ml). Los cultivos de células de mamífero BSC40 fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Dulbecco y Freeman, 1959) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), gentamicina (50 mg/ml), fungizona (0.5 mg/ml) y aminoácidos no esenciales (0.1 mM).

3.1.4. Plásmidos

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon los siguientes plásmidos:

- **pFastBacHTb**. Este plásmido (*Invitrogen*), se utilizó para la generación de rBVs. Los genes heterólogos clonados en este plásmido se encuentran bajo el control del promotor del gen de la poliedrina y están flanqueados por sitios específicos para la transposición del gen recombinante al bácmido. Las proteínas recombinantes producidas mediante el empleo de este vector contienen en su extremo N-terminal una secuencia formada por una repetición de seis residuos de histidina (6xHis) y un brazo espaciador de 16 aa que contiene un sitio de procesamiento específico para la proteasa del virus de grabado de tabaco (TEV).
- **pVOTE2**. Plásmido de inserción y expresión de genes heterólogos en VACV. Las secuencias clonadas en este vector se encuentran bajo el control transcripcional de un

promotor híbrido formado por la secuencia del promotor del bacteriófago T7 fusionada a la secuencia operadora del operón lactosa de *E. coli*. El bloque de inserción, que también contiene el gen de selección xantina guanina fosforibosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt), se encuentra flanqueado por secuencias correspondientes al gen viral A56R que codifica la hemaglutinina de VACV (Ward y col., 1995). Este plásmido fue cedido por el Dr. Bernard Moss (NIH, Bethesda, EEUU).

- **pRSET-A**. En este plásmido (Invitrogen), las secuencias clonadas se encuentran bajo el promotor del bacteriófago T7, lo que ha sido aprovechado para producir los extremos UTR3' del genoma de TaV como RNA mediante transcripción *in vitro* usando la polimerasa recombinante de T7 (Promega).

- **pLEX-2**. Plásmido para expresión transitoria de proteínas mediante transfección en células de insecto (Novagen). La expresión de las proteínas está controlada por el promotor IE1 y elementos regulatorios derivados del virus AcNPV. Las proteínas expresadas contienen una fusión a GST y una repetición de histidinas en el extremo amino terminal mientras que por el extremo carboxilo terminal se encuentran fusionadas a un epítipo derivado de la glicoproteína D de HSV. El vector comercial fue modificado para remover la GST y el tag de 6xHis.

3.1.5. Virus

En el transcurso de este trabajo se emplearon los siguientes virus:

3.1.5.1. Baculovirus

Este virus fue generado mediante manipulación genética a partir de un aislado de campo del virus de la poliedrosis de *Autographa californica* (AcPHV). La generación de baculovirus recombinantes (rBV) se realizó a partir de la cepa BV FastBac (*Invitrogen*).

Todos los baculovirus generados expresan distintos polipéptidos fusionados a 6xHis en su extremo N-terminal a través de un espaciador de 16 aa.

Se utilizaron los siguientes rBVs generados en el presente trabajo:

rBV hORF1. Este virus expresa la proteína del ORF1 de TaV

rBV hORF1 S4A. Expresa la proteína del ORF1 de TaV con una sustitución aminoacídica en el residuo serina 4 por una alanina.

rBV hORF1 T157A. Expresa la proteína del ORF1 de TaV con una sustitución aminoacídica en el residuo treonina 157 por una alanina.

rBV hORF1 D351/352A. Expresa la proteína del ORF1 de TaV con dos sustituciones aminoacídicas en los residuos de aspartato 351 y 352 que forman el sitio activo de la enzima por residuos de alanina.

rBV hORF1 T443/444A. Expresa la proteína del ORF1 de TaV con dos sustituciones aminoacídicas en los residuos treonina 443 y 444 por residuos de alanina.

rBV hORF1 Δ27. Expresa la proteína del ORF1 de TaV con una delección que afecta a sus primeros 27 residuos.

rBV hORF1 Δ27Δ657. Expresa la proteína del ORF1 de TaV con delecciones que afectan a los 27 residuos N-terminales y al extremo C-terminal a partir del residuo 657.

rBV hORF1 Δ611-617. Expresa el dominio polimerasa del ORF1 de TaV comprendido entre los aminoácidos 1 y 657, con una delección que afecta a los residuos comprendidos entre los aminoácidos 611 al 617.

3.1.5.2. VACV

Para la generación de los rVVs VT7/ORF1, se utilizó como cepa parental el virus recombinante VT7LacOI (Ward y col., 1995). Este virus fue cedido por el Dr. Bernard Moss (NIH, Bethesda, EEUU).

Se utilizó el siguiente rVV generado en este trabajo:

rVV VT7/hORF1. Expresa forma inducible la proteína del ORF1 de TaV fusionada a 6xHis en el extremo N-terminal y una secuencia espaciadora de 26 residuos.

3.1.6. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron anticuerpos monoclonales de origen murino contra una repetición de 6 histidinas (*Sigma*) y el epítipo FLAG (DYKDDDDK) (Origene). Contra ésta última secuencia también se empleó un suero policlonal de conejo () generosamente cedido por el Dr. Pablo Gastaminza Landart (CNB, Madrid, España). Además se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos contra diferentes organelas celulares: Anti-PDI y -ERGIC y -dsARN (K1, *English & Scientific Consulting Bt*) y sueros secundarios de cabra anti-Ig de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (verde), a Alexa Fluor 594 (rojo) o a peroxidasa (*GE-Healthcare*).

3.2. Obtención y manipulación de material biológico

3.2.1. PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l con 0.2 μ M dNTPs, 200 ng de cada cebador, 10 ng de DNA molde, 20 mM TrisHCl pH 8.8, 10 nM KCl, 2 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tritón X-100 y 2 U de DNA polimerasa *Pfu Turbo* (Agilent Technology). El protocolo de amplificación fue el siguiente: 1 min a 94 °C; 30 ciclos de 40 seg a 92 °C, 40 seg a 55 °C y 3 min 30 seg a 68 °C; 5 min a 68 °C.

3.2.2. Reacciones de restricción enzimática

Se realizaron con enzimas procedentes de las casas comerciales *New England Biolabs* según las indicaciones del proveedor.

3.2.3. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA

Se realizaron en un volumen final de 20 μ l en un tampón 50 mM TrisHCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 mg/ml BSA; utilizando 200 ng/ml de cada fragmento de DNA y 200 U de T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*). Las reacciones se llevaron a cabo durante 16 h a 16°C.

3.2.4. Generación de plásmidos recombinantes

3.2.4.1. Generación del plásmidos pFastBacHtb ORF1 TaV

La secuencia de 3776 pb de ADN que codifica para el ORF1 del virus de *Thosea asigna* (1257 residuos, 140 kDa, código de GenBank AF282930.1), fue optimizada para la expresión de la proteína en células de insecto Hi5 derivadas de células de huevos de *Tricoplusia Ni* (Invitrogen). Este fragmento de ADN fue sintetizado *in vitro* (GenScript USA Inc.) y se agregaron los sitios para las enzimas BamHI y HindIII en el extremo 5' y 3' del gen respectivamente, con las cuales se clonó en el plásmido pUC57 generando el vector pUC57/TaV ORF1.

1 μ g del vector pUC57/TaV ORF1, fue digerido con las enzimas BamHI y HindIII y el fragmento conteniendo el marco abierto de lectura para la RpRd (3776 pb) fue purificado de un gel de agarosa 1% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) utilizando un kit comercial (QIAquick *gel extraction kit*, QIAGEN). El fragmento recuperado fue ligado al vector pFastBac HTb (Invitrogen) previamente digerido con las mismas enzimas. El producto de

ligación fue transformado en *E. coli* DH5 α y las colonias positivas seleccionadas por su resistencia a ampicilina (50 μ g/ml). El plásmido resultante, obtenido por lisis alcalina de una colonia positiva (pFastBacHtb ORF1 TaV), contiene el ORF1 fusionado a 6xHis en el extremo N-terminal (h ORF1 TaV) separados por un espaciador de 16 aminoácidos.

3.2.4.2. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-ORF1-S4A, -ORF1-T157A, -ORF1-D351/352A, -ORF1-T443/444A, -ORF1-T508A.

Estos plásmidos se generaron mediante mutagénesis dirigida empleando el plásmido pFastBacHtb ORF1 TaV. Para ello, se utilizaron los cebadores enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Generación de plásmidos recombinantes con las mutaciones puntuales. Se indica el plásmido generado, la secuencia de los oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida; y el plásmido empleado como molde para la PCR.

Plásmido	Oligo 5'-3'
pFastBacHtb-ORF1-S4A	GATCCATGGAGGCTGCAAACCCAGTGATCG
pFastBacHtb-ORF1-T157A	CTTACACCGACGGAGCTTGGGCCGGTTTCG
pFastBacHtb-ORF1-D351/352A	GCTTGCTACGGCGCCGCCACCGACATCTAC
pFastBacHtb-ORF1-T443/444A	GACCGGAGTGGTCGGTGCCGCTCTCTTCGAC

3.2.4.3. Generación de los plásmidos pFastBacHtb-ORF1- Δ 27, -ORF1- Δ 27 Δ 657, -ORF1- Δ 611-617.

Para generar los plásmidos con las versiones de delección del ORF1, se obtuvieron por PCR los fragmentos de ADN codificantes para esas proteínas a partir del plásmido pFastBacHtb-ORF1 usando los cebadores enumerados en la Tabla 2.

Tabla 2. Generación de plásmidos recombinantes con las mutaciones puntuales. Se indica el plásmido generado, la secuencia de los oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida; y el plásmido empleado como molde para la PCR.

Plásmido	Oligo 5'-3'
pFastBacHtb-ORF1- Δ 27	1 GCGGATCCGCAGGACCTGGCTGG 2 CCTCTACAATTGTGGTATGGCTG
pFastBacHtb-ORF1- Δ 27 Δ 657	GCGGATCCG CAGGACCTGGCTGG GCGAAGCTTGAGGGTGGCAGCCTCGGG
pFastBacHtb-ORF1- Δ 611-617	1 GTATTTTACTGTTTTCTGAACAG 2 CTCGAACACACCAGCTGGAGGAGCACC 3 GCTCCTCCAGCTGGTGTGTTTCGAGTTC 4 CCTCTACAATTGTGGTATGGCTG

Para la eliminación de una secuencia interna de la proteína en la proteína mutante ORF1- Δ 611-617 se realizaron tres reacciones de PCR. La primera de ellas con los 1 y 2; la segunda con los oligonucleótidos 3 y 4; mientras que la tercera de ellas se llevó a cabo con los oligonucleótidos 1 y 4 pero usando como ADN molde una cantidad equimolar de los productos de las PCRs anteriores.

3.2.4.4. Generación de los plásmidos pVOTE-hORF1 TaV

El vector pFastBacHTb-ORF1 se digirió con la enzima RsrII, luego se rellenaron los extremos cohesivos con el fragmento Klenow (10 min, 25°C, dNTPs). El DNA se recuperó mediante un *kit* comercial (Qiagen) y se digirió con la enzima HindIII. De esta forma, se obtuvo el ORF1 de TaV fusionado a 6xHis y los aminoácidos espaciadores correspondientes.

El vector pVOTE-2, se digirió con NdeI y su extremo cohesivo se rellenó mediante polimerización con el fragmento Klenow para generar un extremo romo. Luego se digirió el vector con la enzima SacI cuya producto de corte cohesivo es compatible con la extremo generado por el corte de la enzima HindIII. En este vector se insertó el ORF1 de TaV y el plásmido resultante, pVOTE-hORF1, fue secuenciado para comprobar la corrección de la secuencia clonada.

3.2.4.5. Generación de los plásmidos pLEX-2.1-His y pLEX-2.1

El vector comercial pLEX-2 (Novagen) fue digerido con las enzimas NcoI y SpeI, y se ligó a un dsDNA formado los oligonucleótidos 5'CATGGGTTCTGGTA3' y 5'CTAGTACCAGAACC3' cuyos extremos cohesivos eran compatibles con los obtenidos tras la digestión del vector. De esta manera se generó el vector pLEX-2.1-His en donde se eliminó la proteína de fusión GST, dejando la repetición de 6xHis, un epítipo S, un sitio de corte para trombina y uno de enterokinasa precediendo al sitio de clonaje múltiple (MCS).

Para generar el vector pLEX-2.1, se digirió el vector pLEX-2.1-His con las enzimas NcoI y BamHI, se rellenaron los extremos cohesivos por acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de E. coli (15 min a 25°C). Tras la la ligación de los extremos romos se obtuvo el vector pLEX-2.1 carente de la secuencia codificante para todos los epítipos de pLEX-2.1-His en el extremo 3' del MCS.

3.2.4.5.1. Generación de los plásmidos pLEX-2.1-His-D1, His-D2 y His-ORF1-Flag

Las secuencias del ORF1 de TaV se obtuvieron por PCR con los oligonucleótidos descritos en la tabla 3. En el caso del ORF1 completo se agregó el epítipo Flag en el extremo 3' del ORF mediante el uso de un megaprimer con esa secuencia. Los fragmentos de DNA obtenidos (pb) se digirieron con las enzimas BamHI y XhoI, se purificaron a partir de gel de agarosa empleando un *kit* comercial y se ligaron al vector pLEX-2.1-His previamente digerido con idénticas enzimas.

3.2.4.5.2. Generación de los plásmidos pLEX-2.1-ORF1-Flag y Δ 27-ORF1-Flag .

Las secuencias del ORF1 de TaV se obtuvieron por PCR usando como molde el vector pFastBacHTb-ORF1 y los oligonucleótidos de la tabla 3, agregándoles mediante el oligonucleótido 2 el epítipo Flag en el extremo 3' del ORF, mediante el uso de un cebador con esa secuencia. Los fragmentos de DNA obtenidos (pb) se digirieron con las enzimas BamHI y XhoI, se purificaron de un gel de agarosa y se ligaron al vector pLEX-2.1-His previamente digerido con idénticas enzimas.

Tabla 3. Generación de plásmidos recombinantes con las mutaciones puntuales. Se indica el plásmido generado, la secuencia de los oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida; y el plásmido empleado como molde para la PCR.

Plásmido	Oligo 5'-3'
pLEX-2.1-His-ORF1-Flag	1 GCGGATCCAGATGGAGGCTTCAAAC 2 GCGCTCGAGTTACTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAAATCCCAGCTACGGTTCTGGTTACC
pLEX-2.1 ORF1-Flag	1 GCGGATCCAGATGGAGGCTTCAAAC 2 GCGCTCGAGTTACTTGTCGTCGTCGTCGTCCTTGTAAATCCCAGCTACGGTTCTGGTTACC
pLEX-2.1 His-D1	1 GCGGATCCAGATGGAGGCTTCAAAC 2 CGCTCGAGTCAGAGGGTGGCAGCCTC
pLEX-2.1 His-D2	1 CGGGATCCCGAGGAAGGAGTC 2 CCTCTACAATTGTGGTATGGCTG
pLEX-2.1 Δ 27 ORF1-Flag	1 GCGGATCCG CAGGACCTGGCTGG 2 CCTCTACAATTGTGGTATGGCTG

3.2.5. Obtención de rBVs

Los rBVs se obtuvieron empleando el sistema denominado Bac-to-Bac (*Invitrogen*). Este método se basa en la transposición de los genes recombinantes en el genoma infectivo del baculovirus contenido en un vector (bácmido) propagado en la cepa de *E.coli* DH10Bac (Luckow y col. 1993). Una vez clonada la secuencia de interés en el plásmido donador, éste es empleado para transformar bacterias DH10Bac donde va a tener lugar la transposición entre el gen recombinante y el bácmido. Una vez seleccionados los bácmidos recombinantes, los rBV son generados mediante transfección de células H5 con los bácmidos correspondientes. Finalmente, los rBV son amplificados mediante infección de células H5 con el sobrenadante procedente de las células H5 transfectadas.

3.2.6. Obtención de rVVs

Para la generación de rVVs, se infectaron células BSC-40 con el virus VT7/LacOI (VT7) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,05 unidades formadoras de placa (PFU) por célula. Tras una hora, las células fueron transfectadas con plásmidos derivados de pVOTE conteniendo el gen de interés. La inserción de los genes recombinantes se produce mediante recombinación homóloga entre el plásmido y el genoma viral. A las 72h.p.i. los virus recombinantes son sometidos a tres rondas de selección mediante la adición de ácido micofenólico. Éste compuesto inhibe el enzima inosina monofosfato deshidrogenasa y

provoca la depleción de nucleótidos púricos. Sólo los virus que contengan genomas recombinantes expresaran el gen Ecogpt, que en presencia de xantina e hipoxantina permite la síntesis de nucleótidos púricos, y por tanto serán capaces de producir una progenie viral infectiva. Los rVVs producidos con este sistema fueron amplificados en células BSC-40

3.3. Infecciones, titulaciones virales y transfecciones.

3.3.1. Infección con rBV

Cultivos preconfluentes de células H5 se infectaron a una MOI de 1-5 PFU/ célula del rBV correspondiente en un volumen mínimo. Tras 1h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio TC-100 suplementado con 2% FCS.

3.3.2. Infección con rVV

Cultivos preconfluentes de células BSC40 y HeLa se infectaron a una MOI de 2 PFU/célula del rVV correspondiente en un volumen mínimo. Tras 1h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con 2% FCS y 2mM IPTG.

3.3.3. Titulación de rVV

Cultivos confluentes de células BSC40 se infectaron con altas diluciones virales. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con 2% FCS. A las 48 h.p.i. las células se fijaron con una solución de formaldehído al 10% durante 2 min a temperatura ambiente y se tiñeron con una solución cristal violeta al 2%. Los títulos se determinaron por recuento de las placas de lisis.

3.3.4. Transfecciones

Las células de insecto H5 fueron transfectadas siguiendo el siguiente protocolo: se incubó 4 µg del vector pLEX-2.1 con una formulación de liposomas compuesta de bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDAB; Sigma) y dioleil-L-α-fosfatidil etanolamina (DOPE; Sigma) en una proporción 1:2,5 para formar el complejo entre liposomas y vector. Esta mezcla se agregó sobre los cultivos celulares y se dejó durante 5 h para finalmente retirar la mezcla y reemplazarla por medio TC-100 con 2% de FCS.

3.4. Expresión y purificación de proteínas, viriones y ácidos nucleicos

3.4.1. Purificación de las proteínas con cola de histidinas

Las infecciones con los rBVs correspondientes se llevaron a cabo como se ha descrito en el apartado 3.3.1. A las 72 h p.i. se recogieron las células y se retiró el sobrenadante mediante centrifugación a 500xg durante 5 min y 4°C. La pastilla resultante se lavó con PBS frío y se volvió a centrifugar. La pastilla resultante se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis 50 mM TrisHCl, pH 8, 500 mM NaCl y 0.1% Igepal CA-360 (*Sigma*), suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete mini; Roche*) por cada placa p150 infectada. Las células se lisaron en hielo durante 30 min. Después, se centrifugaron a 14.000xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se sometió a purificación mediante cromatografía de afinidad a metal (IMAC) empleando una resina unida a cobalto (*TALON Metal Affinity Resin, BD Biosciences-Clontech*) que tiene afinidad por la cola de histidinas. Las proteínas unidas a la resina se lavó 5 veces con el tampón de lavado (Bis-Tris 50 mM pH 6.8; NaCl 500 mM; Igepal CA-630 0.1%, imidazol 15 mM) y se eluyeron con un tampón de elución (50 mM TrisHCl, pH 8, 500 mM NaCl y 500 mM imidazol). El imidazol se eliminó con una columna PD-10 (GE Healthcare).

La proteína se sometió a una segunda ronda de purificación por cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 HR 10/300, GE) y el tampón se reemplazó por MES 50 mM pH 6.0, NaCl 500 mM, glycerol 10%, DTT 5 mM. Finalmente las fracciones que contenían la polimerasa fueron concentradas hasta 10 mg/ml usando filtros VIVASPINTM 10K (Sartorius).

3.4.2. Expresión de proteínas recombinantes en infecciones con rVVs

Cultivos de células HeLa infectados con los rVVs correspondientes fueron suplementados con 2 mM IPTG durante los tiempos indicados en cada ensayo. Los genes que codifican la RNA polimerasa T7 y los elementos reguladores del operón lactosa de *E. coli* están insertados en el genoma del VT7LacOI. El virus expresa constitutivamente el represor lac y la actividad de la RNA polimerasa T7 está bajo el control del operador lac fusionado a un promotor tardío de VACV. La expresión de las proteínas recombinantes tiene lugar tras la adición de IPTG al medio de cultivo (Ward y col. 1995).

3.4.3. Purificación de las proteínas con cola de histidinas a partir de rVV

Las infecciones con el rVV se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 3.3.1. A las 4 h post-inducción se cambió la temperatura a 32°C. El cultivo se recogió a las 72 h p.i., se retiró el sobrenadante mediante centrifugación a 500xg durante 5 min a 4°C. La pastilla resultante se lavó con PBS frío y se volvió a centrifugar. La pastilla resultante se congeló a -

20°C. Se descongeló a 4°C con el agregado de 10 ml de tampón de lisis (10 ml c/5 placas p150) Bis-Tris 50 mM, pH 6.8, 500 mM NaCl, glicerol 10%, arginina y glutamina 50 mM, y 0.1% Igepal CA-360 (*Sigma*), suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete mini EDTA Free*; *Roche*). Las células se lisaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 14.000xg durante 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se sometió a purificación mediante cromatografía de afinidad a metal (*IMAC*) empleando una resina unida a cobalto (*TALON Metal Affinity Resin*, *BD Biosciences- Clontech*). Las proteínas unidas a la resina se eluyeron con un tampón de elución (Bis Tris 50 mM, pH 6.8, 500 mM NaCl, glicerol 10%, arginina y glutamina 50 mM, 300 mM imidazol). El eluido fue sometido a una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-10) para intercambiar el tampón por uno idéntico al de elución pero sin imidazol. Esta muestra fue sometida a una segunda ronda de purificación en una columna de intercambio catiónico (Mono S 5/50, GE Healthcare). La elución de la proteína se realizó con un gradiente salino de 30 volúmenes de columna (VC), desde 20 mM a 1 M con el tampón Bis-Tris 50 mM, pH 6.8, NaCl 1M. Las fracciones de la purificación fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

3.4.4. Transcripción *in vitro* para la generación de ARN moldes

Para la producción de ssARN se usó como molde el vector pRSET-A-TaV-UTR3' linearizado con la enzima EcoRI y el *kit* comercial de transcripción *in vitro* RiboMax (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente 1 ug de ADN molde se empleó en un volumen de reacción de 35 µl incubándose durante 40 min a 37°C y se detuvo con el agregado de 5 ml de 0.5M EDTA pH 8.0. Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa (2%) y fueron detectados mediante tinción con BrEt. El ARN producido se aisló del gel y fue purificado con un dispositivo de electroelución de acuerdo a las especificaciones del fabricante (International Biotechnologies). Finalmente el ssARN fue resuspendido en H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y almacenado a -20°C.

3.5. Análisis Bioquímico

3.5.1. Marcaje metabólico con [³⁵S]-Metionina

Cultivos de células HeLa infectados con el virus de interés y a distintos tiempos p.i., se lavaron y se incubaron con medio de cultivo DMEM carente de metionina durante 30 minutos. A continuación se añadió DMEM carente de metionina y suplementado con 50 mCi/ml de [³⁵S]-Metionina. Tras 30 min a 37°C, se eliminó el medio, las monocapas se lavaron tres veces con PBS y se finalmente se recogieron en tampón Lemmli.

3.5.2. Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

La resolución electroforética de las proteínas se llevó a cabo siguiendo el método de Laemmli de electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras se mezclaron con tampón desnaturalizante 5X (62.5 mM TrisHCl pH 6.8, 1 % SDS, 0.06% azul de bromofenol, 25% glicerol y 10 mM DTT) y se cargaron en geles de poliacrilamida (37.5:1) al 10%. Estos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa o teñidos con una solución de azul de Coomassie al 2% en 10% metanol, 10% ácido acético o secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autorradiografiados.

3.5.3. Electrotransferencia e inmunodetección (*Western Blot*)

Una vez llevada a cabo la separación electroforética mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida, éstos fueron electrotransferidos en condiciones semisecas durante 45 min a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (*Protran*, *Schleicher & Schuell*) tras incubar durante 10 min tanto el gel como las membranas en un tampón conteniendo 48 mM Tris, 39 mM glicina, 0.0375% (p/v), 20% metanol (v/v). Las membranas fueron saturadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente incubadas con el correspondiente anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 10 min con PBS, se incubaron 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo o de ratón conjugado a peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1:5,000 en solución de bloqueo. Las membranas se lavaron 3 veces con PBS durante 10 min y se reveló mediante la utilización del sistema comercial quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*) o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0.025 % de H₂O₂.

3.5.4. Análisis electroforético en geles nativos de agarosa

La resolución electroforética de los ácidos nucleicos se llevó a cabo siguiendo el método de Laemmli de electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras se mezclaron con tampón desnaturalizante 5X (62.5 mM TrisHCl pH 6.8, 1% SDS, 0.06% azul de bromofenol, 25% glicerol y 10 mM DTT) y se cargaron en geles de poliacrilamida (37.5:1) al 10%. Estos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa, teñidos con una solución de azul de Coomassie al 2% en 10% metanol, 10% ácido acético o secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autorradiografiados.

3.5.5. Análisis electroforético en geles nativos de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de los RNA en condiciones nativas, las muestras fueron mezcladas con un tampón conteniendo 10 mM TrisHCl pH 8, 10 mM glicina, 2 mM DTT y cargadas en geles de poliacrilamida al 7% en tampón 0.5X TBE (45 mM TrisHCl pH 8.0, 45 mM ácido bórico, 10 mM EDTA). Tras el proceso de electroforesis, los geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autorradiografiados.

3.5.6. Análisis por filtración en gel

Las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad a metal (apartado 3.4.1.) fueron analizadas por filtración en gel mediante un sistema de cromatografía líquida (*ÅKTA FPLC*, *Pharmacia*) con una columna Superdex-200 5/15 (*Pharmacia*) previamente calibrada con catalasa (158 kDa), albúmina sérica (68 kDa), ovoalbúmina (50 kDa) y quimiotripsinógeno A (21 kDa). El equilibrado de la columna y la cromatografía se llevaron a cabo a un flujo de 0.5 ml/min a 4°C en un tampón conteniendo 20 mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl.

3.5.7. Ensayo de actividad polimerasa

La actividad polimerasa de las diferentes variantes derivadas del ORF1 de TaV, fue determinada según el protocolo previamente descrito (Spies y col. 1987) con algunas modificaciones. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 40 µl conteniendo MES 50 mM pH 6,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM CTP, 0.02 mM UTP, RNasin (20 U), 10 µCi [α -³²P] UTP y 1 µg de proteína. Las muestras fueron incubadas a 35°C durante 1 h, o los tiempos indicados en cada experimento, calentadas a 100°C 3 min para detener la reacción y posteriormente digeridas con 0.2 mg/ml de proteinasa K durante 1h a 37°C. Los productos de reacción fueron resueltos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos del 7% y cuantificadas mediante autorradiografía.

3.6. Cuantificación de la radiactividad incorporada

Las muestras marcadas con isótopos radiactivos fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa (apartados 3.5.5. y 3.5.6.) según la muestra. Los geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y su emisión se registró durante 24 hs en una pantalla fosfoluminiscente (Phosphor Screen, Amersham). La imagen se digitalizó con un escáner *Molecular Imager FX* (Biorad). La marca radiactiva incorporada fue cuantificada mediante el programa ImageJ (Schneider y col. 2012).

3.6. Análisis estructural

3.6.1. Cristalografía y difracción de rayos X.

3.6.1.1. Cristalización de la RpRd de TaV aislada y formando complejos con metales y sustratos RNA y rNTPs

La cristalización de la proteína se abordó utilizando la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Los cribados iniciales de cristalización se hicieron en placas MRC-2 greiner a 20° y 4°, utilizando concentraciones de proteína entre 10 y 20 mg/ml en el tampón 50 mM MES, 500 mM NaCl, 10 % glicerol y 5 mM DTT. Las gotas contenían 100 nl de solución de proteína mas 100 nl de las distintas soluciones de cristalización contenidas en los *Kits* comerciales de Hampton (Hampton research) y Jena (Jena Biosciences). La condición de cristalización hallada en estos ensayos, se optimizó, consiguiendo cristalizar la proteína (10 mg/ml) por el método de gota sentada, mezclando 0.5 µl de proteína con idéntico volumen de la solución precipitante (PEG 8K 12%, Li₂SO₄ 750 mM) y equilibrada contra 750 µl de solución en el reservorio de placas de 24 posillos.

Los co-cristales con el derivado de lutecio, fueron preparados añadiendo cloruro de lutecio (2 mM) al la solución del agente precipitante.

Los complejos RpRd-ARN molde y rNTP sustratos se obtuvieron incubando previamente la proteína (en su tampón con 200 mM NaCl) a 30 °C con los oligonucleótidos **poner secuencia** en presencia de Mn²⁺ y rNTPs durante 30 min. Los cristales de los distintos complejos se obtuvieron en las mismas condiciones de cristalización

Antes de la recogida de datos de difracción en el sincrotrón, los distintos cristales fueron colectados con *cryo-loops* (Hampton Research), embebidos durante 1 min en una mezcla de la solución del reservorio y 20% (v/v) glicerol y congelados por inmersión en nitrógeno líquido.

3.6.1.2. Recogida y procesado de datos

Todos los datos de difracción fueron colectados a 100 K en las instalaciones de radiación del sincrotrón Europeo (*European Synchrotron Radiation Facility*, ESRF, Grenoble, Francia) y el Suizo (*Swiss Lightsource*, SLS, Villigen, Suiza).

Los difractogramas de la proteína nativa, y de los complejos con ligandos (ARN y nucleótidos) fueron colectados mediante oscilaciones de 0.5°, con un tiempo de exposición de 2 s en las líneas indicadas en la tabla **XX**. Los cristales con los derivados de átomos pesados fueron colectados a una energía optimizada para el pico de máxima absorción del átomo de Lu³⁺ (**Tabla XX**). El conjunto de datos se recogió mediante oscilaciones de 2° y 5 s de exposición. Las imágenes de difracción fueron indexadas e integradas usando iMOSFL

(Leslie, 2006; Batty, et al. 2011) y escaladas y promediadas con SCALA (Evans et al., 1993) de paquete de programas CCP4 (Collaborative computational Project, Number 4, 1994).

3.6.1.3. Resolución de la estructura

La determinación de las fases se consiguió aplicando el método de **dispersión anómala múltiple** (SAD). El análisis inicial de los datos determinó que la máxima resolución a usar para determinar la subestructura atómica y el cálculo de fases era de 3.5 Å. La localización y refinado de la posición del átomo de Lu se llevó a cabo usando los programas SHELXC (Sheldrick et al., 2001) y SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002). La mano de la subestructura fue determinada usando el programa ABS (Hao, 2004) y SHELXE (Sheldrick, 2008). La ocupación de la subestructura fue refinada usando el programa BP3 (Pannu et al. 2003). La modificación de la densidad electrónica por promediado molecular, utilizando simetría no cristalográfica (NCS) de orden 2 y aplanamiento de solvente permitió la extensión de fases hasta 3 Å. Este proceso se realizó usando el programa RESOLVE (Terwilliger, 2000). El primer modelo parcial de la proteína fue producido por el programa BUCCANEER (Cowtan, 2006) y usado para mejorar las fases y terminar el trazado usando el programa ARP (PERRAKIS). Todos estos programas fueron empleados en la plataforma Auto-Rickshaw (Panjikar et al. 2009).

El modelo inicial fue empleado para resolver la estructura de la proteína nativa a alta resolución (2.15 Å) por el método de reemplazo molecular usando el programa Phaser (McCoy y col., 2007). Posteriormente esa estructura nativa se usó de reemplazo molecular para resolver las estructuras de los complejos de la proteína con los distintos sustratos.

3.6.1.4. Refinado de las estructuras

Las estructuras fueron refinadas con el programa Refmac5 (Murshudov y col. 2011) dentro del paquete de programas CCP4 (Collaborative computational Project, Number 4, 1994) usando un protocolo de refinamiento considerando restricciones de simetría no cristalográfica (NCS), en los primeros ciclos del refinado y TLSs. La estructura fue validada usando la herramienta *Comprehensive Validation* (Chen y col., 2010) del paquete de programas Phenix (Adams y col., 2007).

3.6.2. Inmunofluorescencia y microscopía láser confocal

Las células Hi5 fueron sembradas sobre discos de vidrio de 12 mm de diámetro y transfectadas como se detalla en el apartado 3.3.4. A las 24, 48, 72 y 96 h p.t. Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y fijadas con una solución de 3%p-formaldehído

durante 10 min. Después de la fijación las células fueron permeabilizadas con 0.01% (v/v) Tritón X-100 en PBS 1X durante 3 min y bloqueadas con 10% FCS en PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente. Tras ello, se incubaron los vidrios durante 1 h a 37 °C con sueros específicos anti-6xHis, anti-Flag, anti-dsARN, anti-ERGIC y anti-PDI, según el experimento. Tras 6 lavados con PBS 1X, los vidrios se incubaron bajo las mismas condiciones con anticuerpos de cabra anti-Ig-ratón o conejo conjugado con Alexa 488 (verde) o Alexa 594 (rojo) diluïdos en PBS 1X conteniendo 10%FCS. Los núcleos fueron teñidos con 4',6-Diamidino-2-phenilindol (DAPI, Sigma) y los vidrios fijados a los portaobjetos con ProLong (Invitrogen). Las muestras se visualizaron por epifluorescencia en un microscopio confocal láser Leica TCS-Sp5 y las imágenes se procesaron usando el programa LAS-AF v.2.6.0 (Leica Microsystems).

3.6.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

3.6.3.1. Procesamiento digital de imágenes y reconstrucciones 3D

2-5 µl de la muestra bajo estudio fueron adsorbidos a una rejilla de microscopía electrónica con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (K100X, Emitech). Las rejillas fueron lavadas 2 veces en agua y teñidas con acetato de uranilo al 2% (p/v). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio Tecnai G2 FEG 200 (FEI) estabilizado a 200 kV y las imágenes se registraron en condiciones de mínima dosis con una cámara CCD (*Charged Coupled Device*) FEI Eagle 4k a una magnificación nominal 67.873X sobre el detector (2.21 Å/píxel).

Las operaciones generales de procesamiento de imagen se realizaron con los paquetes de procesamiento Xmipp (Marabini y col., 1996) y Bsoft (Heymann 2001; Heymann y Belnap, 2007). Xmipp fue empleado para seleccionar manualmente, extraer y normalizar 5.900 y 5.991 imágenes correspondientes al monómero y al dímero, respectivamente, del fragmento RpRd de 75 kDa purificado; así como 9.700 imágenes del mutante Δ27 del ORF1. El rango de desenfoque fue determinado con el programa ctfind3 (Mindell y Grigorieff, 2003) mediante el cálculo de la media radial de la transformada de Fourier promedio de la micrografía. Dicha información fue empleada para invertir las fases de cada micrografía entre las frecuencias adecuadas de la función de transferencia de contraste (CTF). Las imágenes fueron alineadas y clasificadas bidimensionalmente mediante el método de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) (Scheres y col., 2005) para seleccionar una población homogénea de 2.882; 4.244 y 7.507 partículas para el monómero del fragmento RpRd, el dímero del fragmento RpRd y el mutante Δ27 del ORF1, respectivamente.

Para la obtención de una 3D de las muestras estudiadas, se partió de un modelo inicial basado en ruido blanco a partir del cual se determinaron y asignaron los ángulos de proyección de cada una de las imágenes experimentales mediante un proceso de refinamiento angular iterativo. Inicialmente, este proceso se realizó con programa Refine del paquete EMAN (Ludtke et al., 1999). Una vez obtenido un modelo tridimensional próximo a la solución final, se refinó mediante la rutina *Projection Mathcing* de Xmipp. En ambos casos, la reconstrucción de los volúmenes tridimensionales se llevó a cabo empleando el método de reconstrucción en el espacio de Fourier. Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) entre dos mapas independientes que contienen cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en cada reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0,5 (criterio FSC=0,5). El número de partículas incluidas en las 3DRs finales fueron 2.576 y 3.819 para el monómero y el dímero del fragmento RpRd, respectivamente, mientras que para el mutante $\Delta 27$ del ORF1 se usaron 6.756 partículas.

El ajuste de la estructura cristalográfica de la RdRp de TaV en los mapas de densidades de microscopía fue realizado mediante la herramienta Fit del programa UCSF Chimera (Pettersen y col., 2004).

"Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano"

Isaac Newton

Resultados

4.1. Purificación de proteínas

4.1.1. Purificación del ORF1 de TaV a partir de células de insecto

La ORF1 de TaV salvaje (WT) se expresó en células de insecto (Hi-5) empleando el baculovirus rBV-TaV ORF1 que contiene la secuencia correspondiente a la mencionada ORF fusionada a una cola N-terminal de seis residuos consecutivos de histidina (6xHis) bajo el control transcripcional del promotor de la poliedrina de BV. Mediante marcaje metabólico con metionina S³⁵ de células infectadas con el rBV-TaV ORF1, se determinó que el máximo de expresión de la proteína recombinante se alcanzaba aproximadamente a las 48 hpi. No obstante, la proteína recombinante producida sufría una rápida degradación dando lugar a un fragmento proteico de 75 kDa cuya máxima acumulación se producía a las 72 hpi (resultados no mostrados).

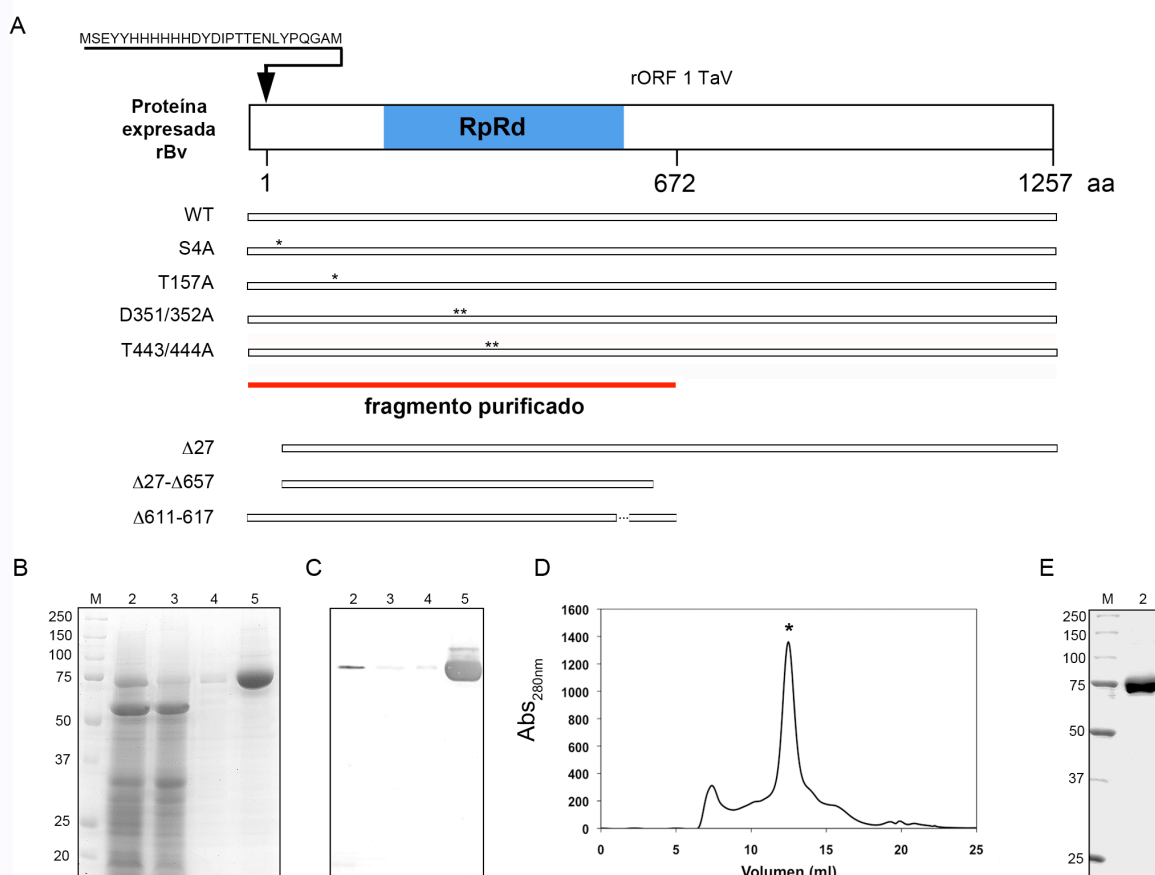


Figura 7. Purificación de la proteína ORF1 de TaV producida en células insecto infectadas con rBVs. A) Esquema de las proteínas expresadas en células Hi5 con el rBV BV-TaV ORF1. La línea roja indica la posición de la región que contiene el fragmento purificado que incluye el dominio RpRd de la proteína (indicado en fondo azul) y el extremo N-terminal de la proteína recombinante que incluye una cola de histidinas, cuya secuencia se indica en la parte superior de la figura, precediendo al primer residuo de de la proteína codificada por la ORF1 de TaV (aa 1-1257). La posición de las diferentes mutaciones puntuales introducidas en la proteína están indicadas como “ * ”. B) SDS-PAGE teñido con azul de *Coomsie* de fracciones correspondientes a una cromatografía de afinidad realizada a partir de un extracto de células Hi5 infectadas con rBV-TaV ORF1 empleando una resina de afinidad a cobalto (TALON). La muestras analizadas corresponden a marcadores de peso molecular (MP), lisado celular (2), eluido inicial (*Flow-trough*) (3), lavado con tampón de unión (4),; eluido final obtenido en presencia de imidazol (5). C) WB de la muestras indicadas en (B) realizado con suero específico α -6xHis. D) Cromatograma de la purificación en Superdex 200. E) SDS-PAGE 11% teñido con azul de *coomasie* de la proteína purificada por Superdex que se indica con “ * ” en el cromatograma (2).

La purificación de ese fragmento mediante cromatografía de afinidad a una resina de Co^{2+} (Fig. 1B) y el posterior análisis de éste mediante digestión trípica y espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) confirmó su identidad. El fragmento de 75 kDa mencionado contiene los primeros 672 aminoácidos de la proteína recombinante que incluyen el dominio RpRd de la proteína codificada por la ORF1 (Figura 7 A) (Gorbalenya y col. 2001). La conservación de la cola de histidinas (6xHis) en el extremo amino terminal permitió su purificación inicial por cromatografía de afinidad, como se describe en Materiales y Métodos (MyM) (Figura 7 B y C). La etapa final de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200) de la cual se recuperó 1 mg del fragmento polimerasa por cada $1,5 \times 10^8$ de células Hi5 infectadas con el rBv TaV ORF1 y con una pureza estimada $>98\%$ (Figura 7 D y E). Según la precalibración de esta columna, la proteína purificada se encuentra como dímero en solución ya que su volumen de exclusión corresponde a una masa molecular de ~ 150 kDa (Figura 7 D). El fragmento polimerasa WT finalmente obtenido, se concentró hasta 10 mg/ml para su cristalización.

Además del fragmento polimerasa WT, otras versiones de la proteína con mutaciones puntuales (S4A, T157A, D351/352A, T443/444A) o deleciones ($\Delta 27$, $\Delta 27\text{-}\Delta 657$ y $\Delta 611\text{-}617$) fueron expresadas (Figura 7 A) y purificadas empleando el mismo procedimiento, sin observarse diferencias en el rendimiento de la purificación. No obstante, es importante destacar la observación de que el mutante $\Delta 27$ del ORF1, carente de los 27 residuos N-terminales no fue la única variante que sufre una clara degradación proteolítica durante su expresión en células de insecto, pudiéndose purificar entera a partir del lisado celular (Figura 8 A). Llamativamente esta proteína se comporta como monómero en solución al someterse a una cromatografía analítica de exclusión molecular (Figura 8 B). Una observación similar se realizó con la versión $\Delta 27\text{-}\Delta 657$ (datos no mostrados).

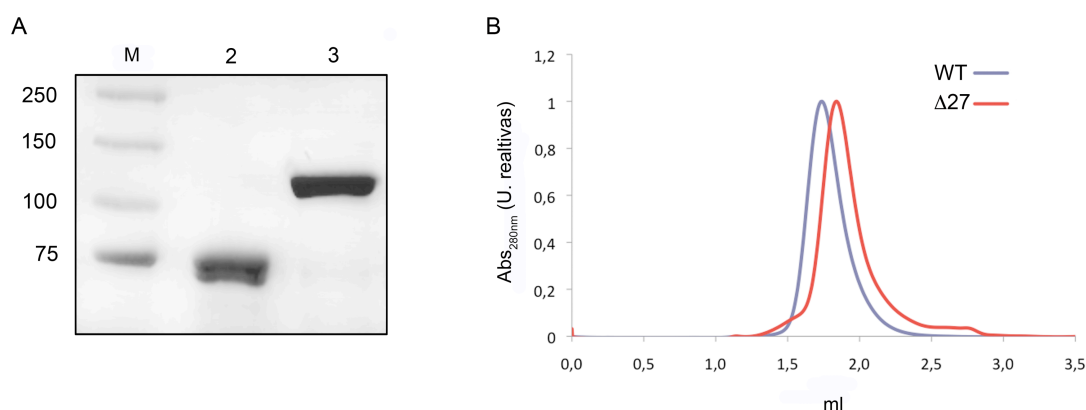


Figura 8. Purificación de las proteínas ORF1 y ORF1 $\Delta 27$ de TaV. A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de muestras correspondientes a marcadores de peso molecular (MP) y las proteínas ORF1 $\Delta 27$ (1) y ORF1 (2) purificadas. B) Cromatogramas obtenidos tras someter las proteínas ORF1 $\Delta 27$ (rojo) y ORF1 (azul) purificadas a una cromatografía de exclusión molecular analítica en una columna Superdex 200 5/150. El eje de las abscisas corresponde al volumen de elución (ml) y el eje de las ordenadas a la absorbancia a 280 nm normalizada.

Se ha descrito que las proteínas recombinantes expresadas en células de insecto suelen ser diana de proteasas celulares, entre ellas, las más ubicuas son las pertenecientes a la familia de cisteín proteasas (Yamada y col. 1990; Kato y col. 2003). Debido a que el ORF1 de TaV expresado en Hi5 es susceptible a proteólisis, se decidió ensayar la influencia del inhibidor leupeptina (hidrocloruro de acetil-Leu-Leu Arg-al), un tripéptido modificado que actúa como inhibidor de numerosas proteasas (base de datos MEROPS), entre las que se incluyen diferentes cisteín proteasas. De acuerdo a lo esperado, la presencia de leupeptina en el medio de cultivo inhibe la degradación del ORF1 de TaV de forma dependiente de concentración. Hemos determinado que la concentración mínima eficaz de leupeptina es aproximadamente 50 μ M (Figura 9 A y B).

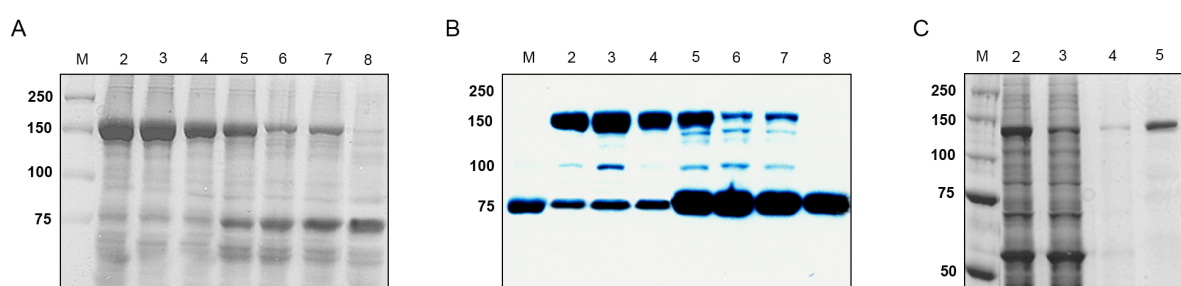


Figura 9. Expresión y purificación de la ORF1 de TaV. A) Efecto de la presencia de distintas concentraciones de leupeptina en el medio de cultivo sobre la integridad de la proteína producida en células Hi5 infectadas con el rBV-TaV ORF1. Las muestras analizadas corresponden a marcadores de peso molecular (MP), los lisados celulares en presencia de 150 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 5 μ M y 0 μ M de leupeptina (2-7). B) WB de las muestras indicadas en (A) realizadas con un suero específico α -6xHis. C) SDS-PAGE 11% teñido con azul de Coomassie de las fracciones correspondientes a una cromatografía de afinidad realizada a partir de un extracto de células Hi5 infectadas con rBV-TaV ORF1 en presencia de leupeptina (100 μ M), empleando una resina de afinidad a cobalto (TALON). Las muestras analizadas corresponden a marcadores de peso molecular (MP), lisado celular (2), eluido inicial (*Flow-through*) (3), lavado con tampón de unión (4), eluido final obtenido en presencia de imidazol (5).

La dosis de leupeptina escogida finalmente fue de 100 μ M. Esta dosis se añadió tanto al medio de cultivo como a los diferentes tampones empleados durante el proceso de purificación. Así se logró purificar el ORF1 de TaV de 140 kDa de peso molecular (Figura 9 C) por cromatografía de afinidad (resina de Co^{2+}) como se detalla en Materiales y Métodos. Si bien el rendimiento de la purificación en este caso fue similar al del fragmento de 75 kDa del ORF1, durante el proceso de concentración se perdió gran parte de la proteína. Esto es debido posiblemente a la interacción del ORF1 de TaV con la membrana del concentrador. No obstante, el pretratamiento de las membranas con una solución que incorpora arginina y glutamina (a una concentración de 50 mM) como agente bloqueante permitió concentrar la proteína a 10 mg/ml, permitiendo llevar a cabo los ensayos de cristalización.

4.1.2. Purificación a partir células BSC40 infectadas con rVV-TaV RpRd

Como alternativa a la utilización de leupeptina para la obtención de la proteína el ORF1 completa, se decidió emplear un método alternativo de expresión basado en la utilización de un virus vaccinia inducible (rVV) (Ward y col.1995). La generación del rVV se llevó a cabo como se describe en la sección de MyM. Este rVV, denominado VV-TAV ORF1, contiene un gen quimérico idéntico al clonado en el genoma del BV-TaV ORF1. Como se detalla en la sección de MyM, tras una serie de experimentos preliminares se determinó que las condiciones óptimas de expresión se obtenían infectando cultivos de células BSC-40 a una MOI de 0.8 pfu/célula y manteniendo los cultivos durante 72 h.p.i. a 32 °C en presencia del inductor IPTG (1 mM). La proteína recombinante producida a esta temperatura presenta un nivel de solubilidad muy superior a la obtenida a 37°C, temperatura habitual para cultivos de células de mamífero. Esta proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad (resina de Co^{2+}) seguida por una cromatografía de intercambio catiónico para aislar la proteína entera de los fragmentos resultantes de su degradación parcial (Figura 10). La pureza final obtenida (> 98%), fue suficiente para abordar la concentración de la proteína hasta 8 mg/ml e iniciar las pruebas de cristalización utilizando las distintas soluciones comerciales para el cribado de las condiciones iniciales de cristalización.

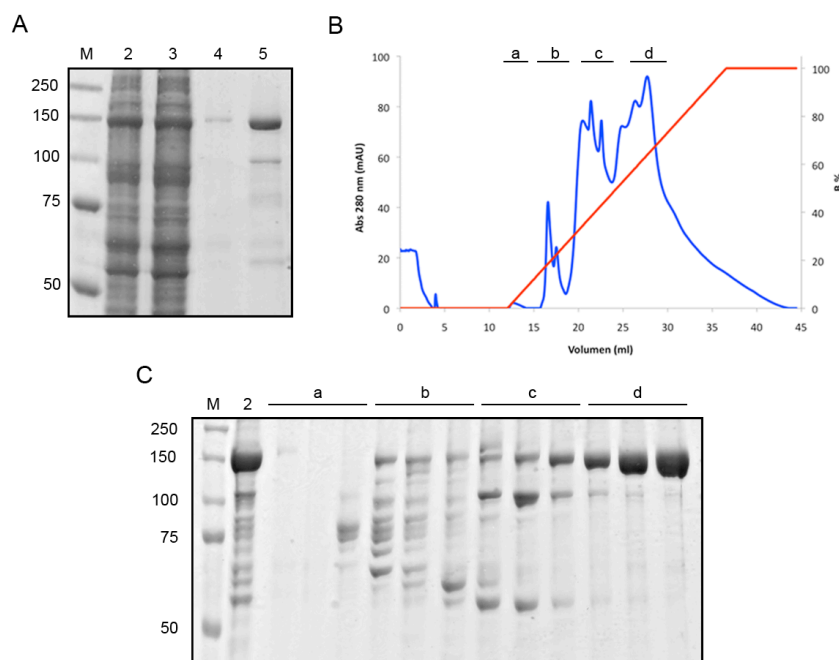


Figura 10. Purificación de la proteína ORF1 de TaV producida en células de mamífero BSC-40 infectadas con el VV TAV ORF1. A) SDS-PAGE 11% teñido con azul de *Coomassie* de las fracciones correspondientes a una cromatografía de afinidad realizada a partir de un extracto de células BSC-40 infectadas con VV TAV ORF1 empleando una resina de afinidad a cobalto (TALON). La muestras analizadas corresponden a marcadores de peso molecular (M), lisado celular (2), eluido inicial (*Flow-through*) (3) , lavado con tampón de unión (4),; eluido final obtenido en presencia de imidazol (5). B) Cromatograma de la etapa de purificación posterior de la proteína por cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono S 5/50. La cromatografía fue monitorizada por absorbancia a 280 nm (curva en azul) y en rojo (B%) indica el porcentaje de tampón salino que se usó para eluir la proteína. C) SDS-PAGE 11% teñido con azul de *Coomassie* blue de fracciones representativas de las purificación; las muestras analizadas corresponden al marcador de peso molecular, y las fracciones de los sectores indicados en el cromatograma (B) con las letras a, b, c y d.

4.2. Caracterización funcional del ORF1 de TaV

4.2.1. Ensayo de polimerización *in vitro*

La caracterización de la actividad RdRp mediante el empleo de ensayos enzimáticos *in vitro* se ha descrito en numerosas publicaciones. En estos ensayos bioquímicos, la actividad ARN polimerasa se detecta por la incorporación del NTP α -P³² (en general UTP) en la cadena de ARN recién sintetizada.

Según se pudo comprobar en este estudio mediante la resolución de la estructura cristalográfica de la proteína, detallada más adelante, el fragmento de 75 kDa amino terminal del ORF1 de TaV cuenta con todos los elementos estructurales necesarios para la llevar a cabo la polimerización de ARN. Para comprobarlo, se realizaron ensayos de polimerización *in vitro* usando como molde un ssARN de 311 nts cuya secuencia (5'→3') está compuesta de 171 nts de secuencia heteróloga seguidos por 140 nts que corresponden al UTR 3' del genoma de TaV (Zeddarn y col. 2010).

Los ensayos bioquímicos muestran que el fragmento del ORF1 de TaV purificado a partir de células Hi5, es capaz de sintetizar una cadena de ARN a partir de un ARN molde de simple cadena (Figura 11 A) en las condiciones de reacción *in vitro* (ver MyM). Esta reacción es dependiente de la presencia de iones divalentes, en el experimento mostrado se empleó Mg²⁺. Estos datos muestran además que la polimerización no requiere la adición de un ARN cebador..

El ARN sintetizado por el dominio RpRd de TaV, es de menor peso molecular que el ARN molde (Figura 11 B) lo que indica una polimerización incompleta. Salvo indicación contraria, los experimentos subsiguientes fueron analizados teniendo en cuenta exclusivamente la presencia de esta banda radiactiva descrita en el párrafo anterior.

Como se muestra en la figura 5 A, la adición a la mezcla de reacción de un exceso de un ARN cebador de 8 nt, capaz de hibridar con una secuencia interna del UTR 3', no es elongado pero tampoco inhibe la reacción de polimerización (Figura 11 A).

Por otra parte, el empleo de un ARN molde con una secuencia no relacionada con el genoma de TaV(en el experimento se ha usado el UTR 3' del genoma del nodavirus *Striped Jack Nervous Necrosis Virus*, SJNNV), demostró que la actividad RpRd no requiere de una secuencia específica para iniciar la reacción de polimerización (Figura 11 A). Sin embargo, la apariencia difusa de la banda de ARN generada podría indicar que la polimerización es

ineficiente e incompleta, ya que el ARN molde posee 8 nt más que el molde usado con el UTR 3' de TaV.

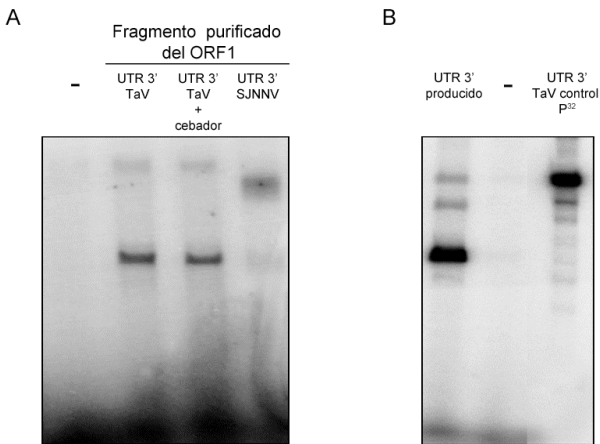


Figura 11. Actividad polimerasa *in vitro* de la RpRd de TaV determinada por la incorporación de UTP a-P³². Imágenes de la pantalla de captura radiactiva (*Phosphorimager*) de geles PAGE 7% revelada tras 24 hs de exposición con los resultados de la polimerización de la RpRd. A) Usando como molde un ssARN de 315 nts con la secuencia del UTR 3' del genoma de TaV y en presencia de un cebador de 8 nts, o con una secuencia de ARN inespecífica correspondiente al UTR 3' del nodavirus SJNNV. Como control negativo (-) se empleó una mezcla de reacción sin Mg²⁺. B) RNA producido por el fragmento cristalizado de la RpRd de TaV usando como molde el ssRNA de 315 nts, control negativo y el mismo ssRNA molde marcado radiactivamente con UTP a-P³² durante su fabricación *in vitro* con la polimerasa del fago T7 y el vector pRSET-A-UTR3-TaV.

De los ensayos de polimerización con oligonucleótidos cortos (6-12 nt) de secuencia específica del UTR 3', se puede deducir que la RpRd no necesita de una estructura secundaria que promueva la polimerización (Figura 12). No obstante y a pesar de no poseer especificidad de secuencia bajo las condiciones de reacción ensayadas, algunos oligonucleótidos cortos de secuencia aleatoria no fueron polimerizados (Figura 12 B). Llamativamente, estos no poseían una G en el extremo 3', lo que parece ser un requerimiento para la actividad polimerasa.

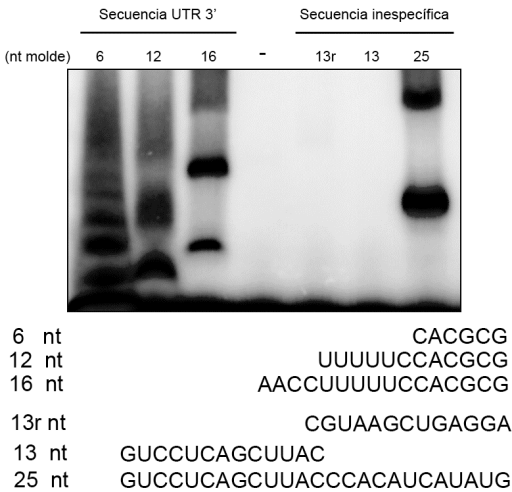


Figura 12. Actividad polimerasa *in vitro* de la RpRd de TaV determinada por la incorporación de UTP a-P³². Imagen de la pantalla de captura radiactiva (*Phosphorimager*) de un PAGE 15% revelada tras 72 hs de exposición con los resultados de la polimerización de la RpRd usando como molde oligonucleótidos de 6, 12 y 16 nts pertenecientes al extremo del UTR 3' y otros de mayor tamaño mayor (13 y 25 nt) pero de secuencia no relacionada con TaV perteneciente al genoma de IBDV. 13r corresponde a la secuencia reversa y complementaria del oligo de 13 nt. Como control negativo (-) se empleó una mezcla de reacción sin Mg²⁺.

En su conjunto, estos resultados permiten asegurar que el fragmento cristalizado de la ORF1 de TaV es activo *in vitro* como RpRd, siendo capaz de sintetizar ARN *de novo*, empleando un ssARN molde de tamaño y secuencia inespecífica.

4.2.2. Estudio de las variables de reacción y cinética de polimerización

El protocolo de reacción *in vitro* permitió comprobar que la actividad RpRd de TaV, al igual que el resto de las polimerasas conocidas, es estrictamente dependiente de iones divalentes como Mg^{2+} y Mn^{2+} (Figura 13 A). El Mn^{2+} como único cofactor, es el más potente para la reacción de polimerización como se ha descrito en otros casos (Arnold y col. 1999; Arnold y col. 2004; van Dijk y col. 1995; Selisko y col. 2006). La sustitución de los iones antes mencionados por otros divalentes de diferente radio atómico como Ca^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+} , provoca un claro efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima (Figura 13 B). Contrariamente a lo observado para la RpRd de IBDV, que también posee la permutación en el subdominio de la palma (Letzel y col. 2007), la presencia de Co^{2+} no favorece la polimerización con respecto a otros iones.

Otras variables de la reacción como el pH del tampón, la temperatura y el contenido salino de la mezcla de incubación repercuten notoriamente sobre la actividad enzimática. La actividad de la RpRd se ve favorecida a pH 6 (Figura 13 C), que coincide con el pH de mayor estabilidad de la proteína (datos no mostrados). En ese valor, los aminoácidos básicos de la proteína que interaccionan con el ARN se encuentran fuertemente cargados, lo que puede favorecer la actividad de la enzima. La temperatura de 35 °C que maximiza la reacción (Figura 13 D), es elevada si se considera que el cultivo de las células de insecto *in vitro* sucede a 28 °C, pero se aproxima a la que existe en el hábitat del huésped de TaV. Por otra parte, la reacción se inhibe a la vez que el contenido salino aumenta (Figura 13 E). Esta relación inversa se produce probablemente por un incremento en la capacidad de apantallar las cargas a medida que eleva la concentración de NaCl, lo que disminuye la interacción entre el ARN molde y la polimerasa.

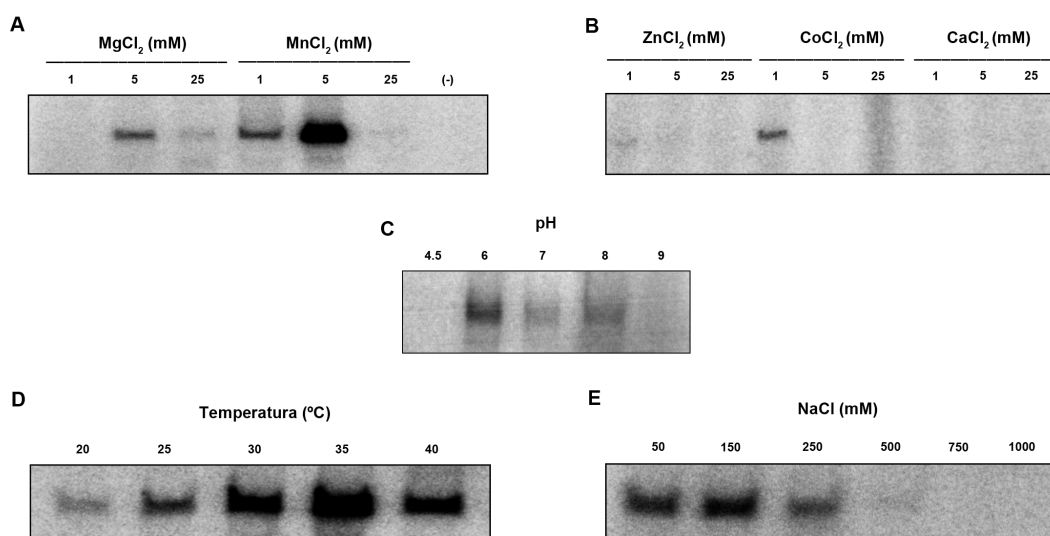


Figura 13. Variables en la actividad de la RdRp de TaV *in vitro*. Efectos de las diferentes concentraciones de iones Mg^{2+} y Mn^{2+} , típicamente usados por las polimerasas, sobre su actividad (A) y el reemplazo por otros iones divalentes (B). El pH del tampón de la reacción (Citrato 50 mM pH 4.5, MES 50 mM pH 6, NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH 7, Tris-HCl pH 8, Bicina pH 9) incide sobre eficiencia de la polimerización. La temperatura durante el ensayo de polimerización altera la actividad de la enzima (D), al igual que la fuerza iónica del tampón (D) cambiada con diferentes concentraciones de NaCl (E).

También se determinó que la polimerización depende directamente de la concentración de proteína (Figura 14 A) pero alcanzando un máximo de saturación. Lo mismo sucede con los nucleótidos (en este caso solo se ensayó la incorporación de GTP α - P^{32}), cuya concentración incide directamente sobre la actividad de la enzima describiendo una curva de saturación.

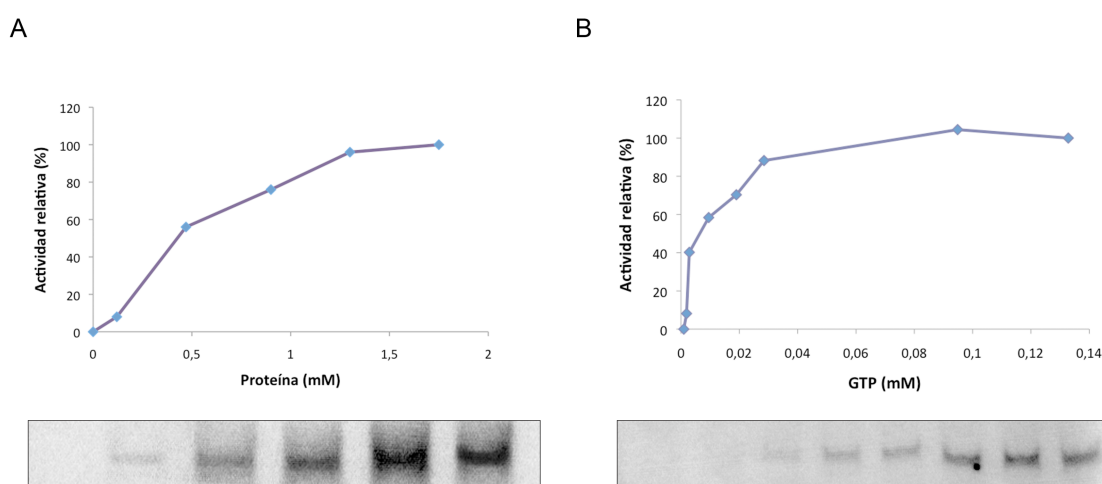


Figura 14. Efectos de las concentraciones de proteína y GTP sobre la actividad de la RdRp de TaV. Determinaciones densitométricas sobre un PAGE 7% con el ARN marcado sintetizado con diferentes cantidades del fragmento de RdRp cristalizado (A) y diferentes concentraciones de GTP α - P^{32} (B).

Aplicando las condiciones óptimas de polimerización para esta enzima establecidas anteriormente, NaCl 150 mM, 35 °C, MES 50 mM pH 6 y MnCl₂ 5 mM, 1.3 mM de RpRd, se realizó un análisis cinético de su actividad (Figura 15 A y B). La incorporación de UTP α -P³² presenta una cinética en apariencia sigmoidea con una etapa de poca síntesis de ARN, una de inflexión para terminar en una etapa de saturación (Figura 15 A y B).

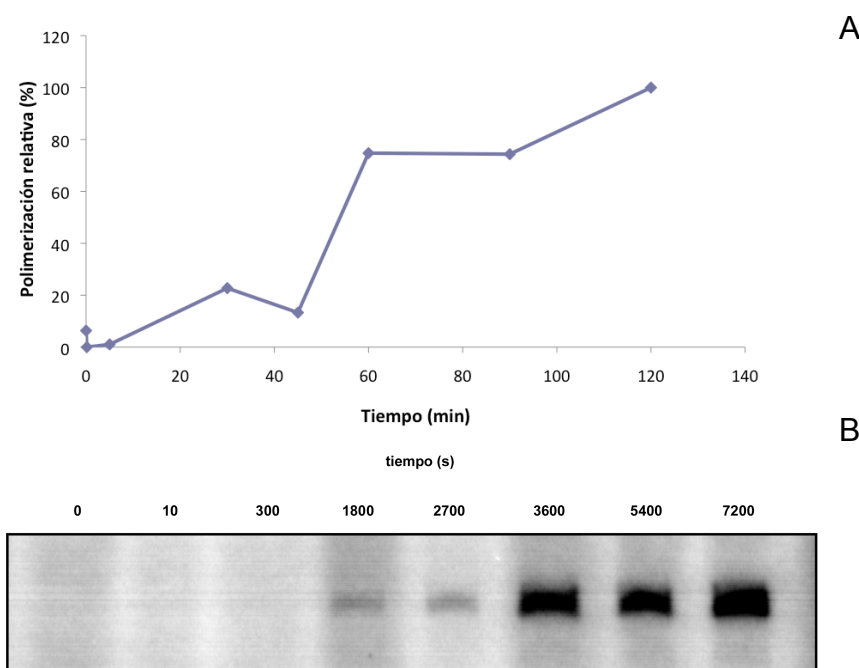


Figura 15. Cinética de polimerización del dominio amino terminal del ORF 1 de TaV. Imagen de la pantalla de captura radiactiva (*Phosphorimager*) de un PAGE 7% revelada tras 24 hs de exposición con los resultados de la polimerización de la RpRd a distintos tiempos usando como molde ssARN de 200 nt del UTR 3' de TaV (A). Curva cinética graficada a partir de las cuantificaciones densitométricas del gel mostrado (B).

Todos estos resultados, demuestran que la actividad del fragmento de 75 kDa del ORF1 de TaV es modulada por cambios en la concentración de los componentes de reacción y su patrón cinético no responde a un perfil enzimático similar al de Michaelis-Menten.

4.3. Análisis estructural del ORF 1 de TaV

4.3.1. Estudio cristalográfico y difracción de rayos X del ORF1 de TaV

A pesar de contar con distintas fuentes de proteína WT, solo el fragmento de ORF 1 producido en células de insecto a partir del rBv pudo ser cristalizado (ver MyM). En esta memoria se presenta la estructura de la proteína WT que comprende el dominio RpRd en 5 versiones: (i) en presencia de acetato de lutecio (III), (ii) apoenzima, (iii) holoenzima con CTP/Mg²⁺, (iv) holoenzima con ssARN molde, y (v) con ssARN molde más CTP/GTP/Mn²⁺.

La calidad de los conjuntos de datos medidos y también las estadísticas del proceso de refinado de las estructuras se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Calidad de los datos de rayos X medidos y refinados de las distintas estructuras

Estadística de los datos medidos					
Parámetros	Nativo	Lu ³⁺	CTP/Mg ²⁺	RNA	RNA G/CTP
λ (Å)	0.98	1.3404	0.97627	1.0000	1.0000
Grupo especial	P2 ₁ 2 ₁ 2	C222 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2	I222	I222
Celda unidad (Å)					
a	134.97	154.05	137.70	143.42	142.51
b	150.82	224.57	149.60	159.04	158.33
c	100.61	128.29	100.10	218.10	217.09
Resolución (Å)	39.0 – 2.15	63.52-3.0	30.0-2.25	30.1-3.1	30-3.5
Reflecciones totales	503448	285828	117550	59476	
Línea	ID14.4 [†]	ID23.1 [†]	ID23.1 [†]	PXI [‡]	ID23.1 [†]
Reflecciones únicas	109020(15398)	44236 (6247)	44236 (6247)	24387 (3455)	44236 (6247)
Multiplicidad	4.6(3.0)	6.5 (5.9)	3.1 (3.1)	2.4 (2.2)	3.1 (3.1)
Compleitud	97.5(95.6)	98.7 (96.5)	98.6 (98.7)	53.8 (52.8)	98.6 (98.7)
R _{merge} (%)	12.0(29.4)	11.6 (37.9)	11.5 (30.0)	12.4 (37.6)	11.5 (30.0)
I/ σ (I)	9.0(4.1)	13.3 (4.5)	14.0 (7.0)	6.8 (3.1)	14.0 (7.0)
f'		-24.87			
f''		34.98			
Estadísticas del refinado de las estructuras					
Rango de resolution	39.6-2.15	63.52-3.0	30.0-2.25	30.1-3.1	48.35-3.5
Nº de amino ácidos	1325	1325	1328	1323	1325
Moléculas de solvente	618		618	8	
Moléculas de Glicerol, SO4=, otros ligandos		5	33	5	5
Valor B promedio(Å ²)	23.70	24.28	24.28	37.18	37.40
R _{factor} (%)	19.13	19.53	19.53	20.62	26.71
R _{free} (%)	22.15	22.73	22.73	24.89	29.25
Rmsd Longitud de enlace	0.0058	0.0062	0.0062	0.0053	0.0114
Rmsd Ángulo de enlace	1.0325	1.1251	1.1251	0.8890	1.1950
RAMACHANDRAN PLOT					
zonas favorables (%)	98	98	98	94	98
zonas generosamente permitidas (%)	1	1	1	1	1
R. en zonas desfavorables (%)	1	1	1	5	1

[†] European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Francia.

[‡] Swiss Lightsource (SLS), Paul Scherrer Institut, Villigen, Suiza.

4.3.1.1. Estructura de la RpRd de TaV con átomos pesados

La determinación de las fases experimentales por el método de dispersión anómala simple (SAD) usando iones de lutecio (Lu³⁺) como dispersantes anómalos. En el diagrama de Patterson se identificó un pico correspondiente a la dispersión anómala del átomo pesado que estaba en la unidad asimétrica (Figura 16 A) del cristal con un grupo espacial C222₁. Su ubicación permitió calcular las fases y resolver la subestructura atómica de los átomos pesados. Con esas fases se calculó un mapa de densidad electrónica a 3 Å resolución que permitió trazar la cadena de la proteína y refinar su estructura. La unidad asimétrica estaba formada por un dímero de la proteína cuyas cadenas se denominaron A y B, para las cuales se pudieron asignar 663 y 662 aminoácidos respectivamente. La cadena A comprende los aminoácidos 10 al 662 y la B, desde 10 al 661 de la secuencia de la

proteína viral. Quedando excluidos además los 30 primeros residuos pertenecientes a la proteína recombinante que incluye la cola de 6 histidinas y, el sitio de reconocimiento y corte de rTEV y residuos espaciadores.

El ión se encontró formando parte de una de las interacciones que establecen los dímeros en la unidad asimétrica (Figura 16 B). Los contactos se establecen entre dos residuos ácido aspártico (D140 y D142) de la cadena A con el ión y a su vez, con los mismos residuos de la cadena B de otro dímero.

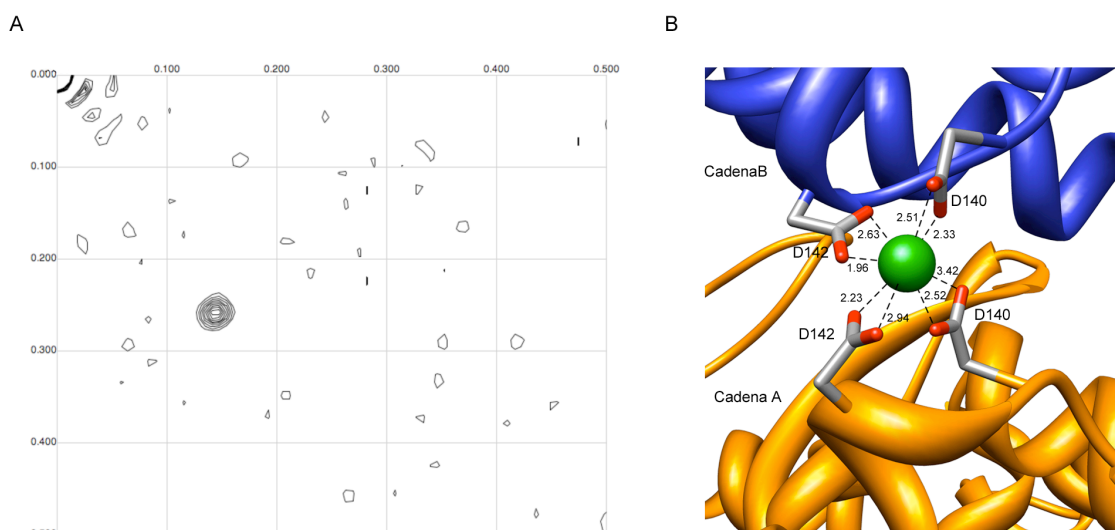


Figura 16. Átomos pesados en la estructura de la RpRd de TaV. Sección Harker (sección 0, Y=0.000) del diagrama de Patterson calculado a partir de las imágenes recogidas con la difracción de un cristal de la RpRd de TaV co cristalizada con átomos de acetato de lutecio (III) (A). Localización del ión Lu^{3+} (en verde) en la estructura de la polimerasa en la interfase entre dímeros de dos unidades asimétricas adyacentes (B).

Las descripciones del resto de la estructura se harán en el apartado siguiente donde se obtuvo un modelo de apoenzima a mayor resolución.

4.3.1.2. Estructura de la RpRd de TaV como apoenzima.

La estructura del dominio RpRd de TaV en ausencia de iones, fue resuelta a 2.15 Å de resolución (ver tabla 4). Esta consta de un dímero en la unidad asimétrica con los mismos residuos que en la estructura con Lu^{3+} . El alineamiento de ambas moléculas demuestra que no existen cambios significativos entre los monómeros (rmsd=0.29). En ninguna de las moléculas son visibles los primeros 30 residuos del extremo amino terminal de la proteína recombinante.

El monómero del dominio RpRd de TaV es una proteína globular de 91552 Å³ (VADAR, Willard y col. 2003) con una cavidad central de 9215 Å³ (MOLE2.0, Petrek y col. 2007). La estructura está formada por 23 hélices α , 7 hélices 3_{10} , 11 hebras β y varios lazos, que unen estos elementos de estructura secundaria, distribuidos en los tres dominios que

contienen todas RpRd virales conocidas (Ferrer-Orta y col. 2006): i) central (residuos 158 a 593); ii) amino terminal (residuos 10 a 157); y iii) dominio carboxilo terminal (residuos 594 a 672) (Figura 17).

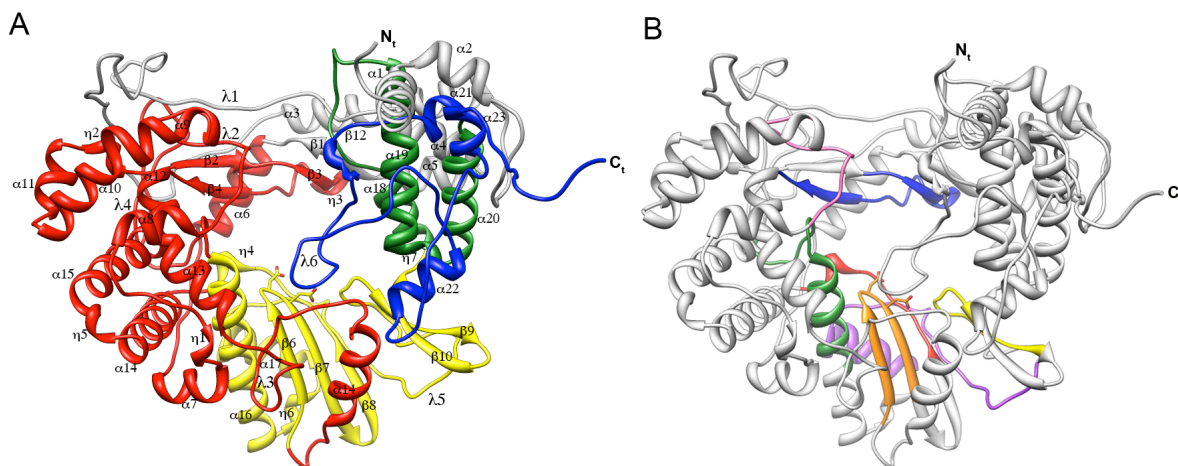


Figura 17. Estructura del dominio RpRd del ORF1 de TaV. . (A) La polimerasa presenta una arquitectura típica de mano derecha cerrada con los sub dominios de los dedos (rojo), pulgar (verde) y palma (amarillo) acotados entre los dominios amino (gris) y carboxilo (azul) terminales, como se muestra en el diagrama de cintas que representa los elementos de estructura secundaria rotulados. α : alfa hélice, β : hebras beta, η :hélice 3₁₀, λ : lazo o loop (B) Distribución de los motivos de secuencia conservados en las RpRd, (motivo A, rojo; B, verde; C, naranja; D, violeta; E, amarillo; F, azul; G, rosa) en la estructura de la polimerasa de TaV. Los extremos amino y carboxilo terminales están indicados como N_t y C_t, respectivamente.

En el dominio central se encuentran los subdominios de los dedos, pulgar y palma (Figura 17 A) que confieren a la enzima la forma de “mano derecha cerrada” típica de las ARN polimerasas. Dentro de ella se pudieron identificar los motivos de secuencia A a G característicos de las RpRd (Figura 17 B).

El subdominio de los dedos comprende los residuos 158 a 342, y está compuesto principalmente por las alfa hélices $\alpha 4$ a $\alpha 14$ y los lazos $\lambda 1$ (aa 77-129), $\lambda 2$ (aa 207-223), $\lambda 3$ (aa 303-324) y $\lambda 4$ (aa 416-443).

El subdominio del pulgar, está formado por los residuos 534 al 592 que se organizan dando lugar a las alfa hélices $\alpha 18$, $\alpha 19$ y $\alpha 20$. Las estructuras de este subdominio interaccionan con un extremo de los dedos formado por las hélices $\alpha 4$ (aa 130-139) y $\alpha 5$ (aa 141-154). Esta interacción entre el pulgar y los dedos (Figura 18) se ha descrito en diferentes polimerasas como la encargada de cerrar la cavidad principal de la enzima, dando la forma de mano cerrada característica de las RpRds (Choi y col. 2004; Malet y col. 2007; Yap y col. 2007),. En el caso de la estructura del dominio polimerasa de TaV, además de la interacción entre la punta de los dedos y el pulgar, el dominio amino terminal también se encuentra interaccionando con ambos subdominios para contribuir al cierre de la cavidad

(Figura 18). La $\alpha 2$ y los aminoácidos que conectan esta hélice con la $\alpha 3$, interaccionan con el lateral exterior del subdominio pulgar. Por otra parte, el gran lazo $\lambda 1$ establece numerosos contactos con la parte superior del subdominio de los dedos. Ambas interacciones del dominio amino terminal se encuentran conectadas por la hélice $\alpha 3$ (aa 53-72) que se posa sobre la punta de los dedos que establece el contacto dedos-pulgar. Estas abundantes interacciones entre dominios establecen un robusto cierre para la cavidad central de la enzima, característica que destaca en esta polimerasa.

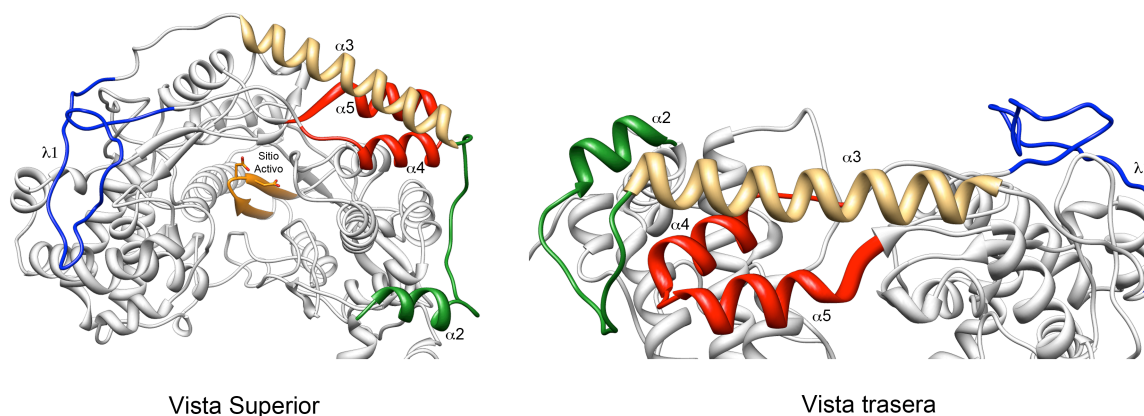


Figura 18. Vistas de las interacciones entre subdominios para cerrar la cavidad de la polimerasa polimerasa. El típico contacto hallado en las RpRds está presente en la polimerasa de TaV. La punta del subdominio de los dedos (en rojo) formado por las alfa hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ interacciona con las hélices del subdominio del pulgar. Además de este contacto el dominio amino terminal establece tres contactos entre dominios. En verde se indica la región del dominio que interacciona con la parte superior del subdominio del pulgar. En azul se indica la porción del lazo $\lambda 1$ que interactúa con la zona superior del subdominio de los dedos. En marrón claro, la hélice $\alpha 3$ sobre el extremo de los dedos. En naranja se muestra el sitio activo con los residuos aspárticos catalíticos (D351 y D352).

La porción principal del subdominio de la palma, está formado por una lámina β compuesta por tres hebras beta ($\beta 6$ - $\beta 8$), flanqueadas por la alfa hélice $\alpha 16$, el lazo $\lambda 5$ (aa 484-516) y las hebras beta $\beta 9$ y $\beta 10$. Entre las hebras $\beta 6$ y $\beta 7$ se halla la secuencia GDD del motivo C, que contiene dos de los residuos catalíticos de ácido aspártico presentes en casi todas las polimerasas (Kamer y col. 1984). Una excepción son las enzimas de los Birnavirus que presentan la secuencia ADN en lugar de GDD (Shwed y col. 2002).

El papel esencial de la secuencia GDD en TaV se ha demostrado en los ensayos de polimerización *in vitro* (Figura 19). La sustitución de estos aminoácidos por residuos de alanina elimina la capacidad de la enzima de polimerizar ARN.

La conectividad de los motivos de la lámina β del subdominio de la palma, es no canónica (Figura 19) como se había descrito previamente por análisis de la estructura primaria de la proteína (Gorbalenya y col. 2002). En ella, los aminoácidos del motivo C,

presentes en las hebras $\beta 6$ y $\beta 7$ de la estructura, se hallan antes de los aminoácidos que forman el motivo A.

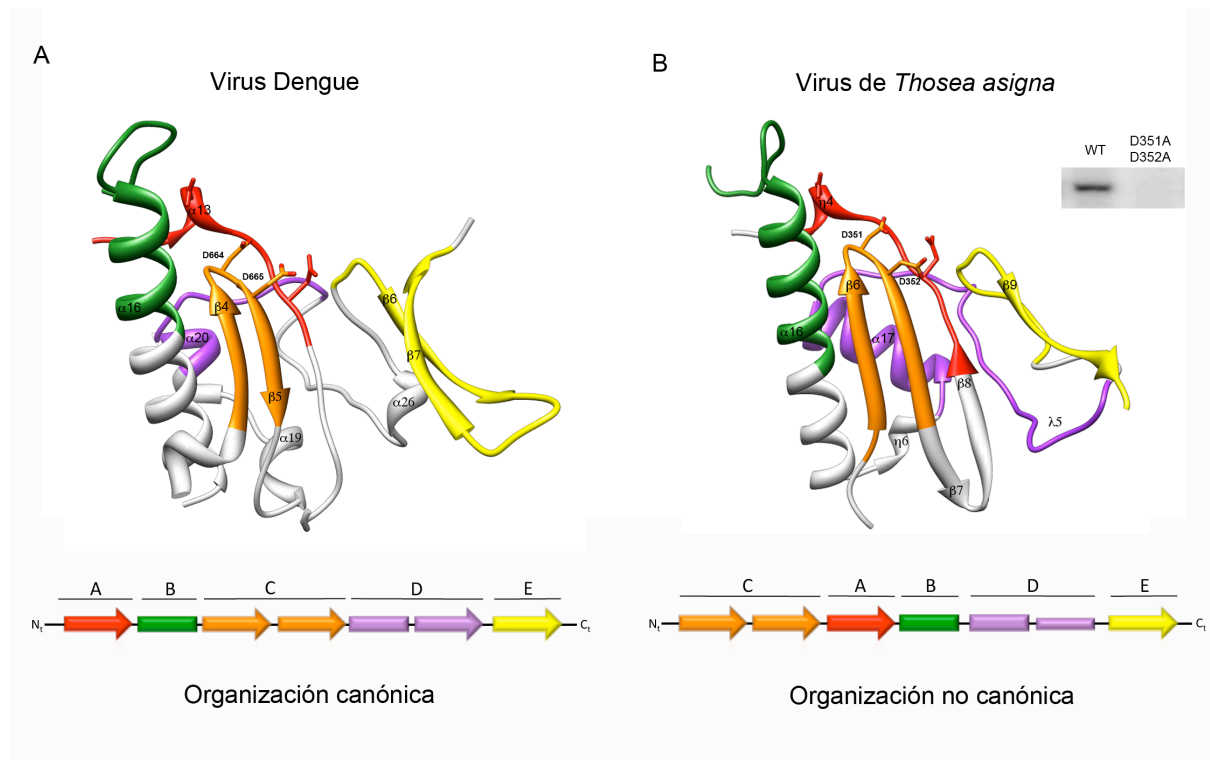


Figura 19. Subdominio de la palma de las RdRps. A) Organización espacial de los motivos conservados en las polimerasas en el subdominio de la palma de la RpRd del virus Dengue. Los motivos se organizan de una manera canónica en la secuencia de esta polimerasa, iniciando por el motivo A (rojo) y seguido por los motivos, B (verde), C (naranja), D (violeta) y E (amarillo). En el motivo C se destacan residuos Asp catalíticos. B) Organización espacial de los motivos en el subdominio de la palma de la RpRd de TaV. Si bien la arquitectura está conservada con respecto a otros virus con genoma ssARN como Dengue, la organización de los motivos en la secuencia es no canónica. El motivo C se encuentra precediendo el motivo A, B y D, como se muestra en el esquema. En el motivo C se destacan los residuos Asp catalíticos. La sustitución de estos aminoácidos por alaninas produjo una polimerasa inactiva como se demostró por ensayos in vitro por incorporación de UTP α -P³², como se detalla en el margen superior.

La estructura ha demostrado que a pesar de la permutación en la secuencia, la arquitectura de los motivos del centro activo en TaV se mantiene intacta, con una disposición espacial de los residuos catalíticos equivalente a las polimerasas con un dominio de la palma canónico (Figura 19)

El alineamiento estructural de la RpRd de TaV con otras polimerasas virales canónicas y no canónicas (Tabla 5) de diferentes familias virales, demostró que esta enzima se asemeja más a la polimerasa de los Flavivirus, en especial el virus *West Nile* (rmsd más bajo), que al resto de estructuras con permutaciones en el subdominio de la palma (IBDV, IPNV).

Tabla 5. Desvíos cuadráticos medios (rmsd) en Å de los alineamientos estructurales entre polimerasas representativas de las diferentes familias virales con el menor rmsd.

Nº	Virus	Código pdb	Familia	1	2	3	4	5	6	7	N, Promedio \pm SD [§]
1	TaV		<i>Permutotetraviridae</i>		2.941	4.122	3.253	2.649	2.380	3.081	
2	IPNV	2YI9	<i>Birnaviridae</i>	2.941		4.210	4.221	3.802	3.925	3.103	2, 3.0 \pm 0.1
3	Rotavirus	2R7O	<i>Reoviridae</i>	4.122	4.210		3.944	3.995	3.770	3.894	2, 4.29 \pm 0.2
4	φ 6	1HI8	<i>Cistoviridae</i>	3.253	4.221	4.104		3.253	2.909	2.079	1, 3.2
5	CV	3DDK	<i>Picornaviridae</i>	2.649	3.802	3.995	1.800		2.153	1.594	4, 2.9 \pm 0.2
6	WNV	2HFZ	<i>Flaviviridae</i>	2.380	3.925	3.770	2.909	2.153		2.627	4, 2.6 \pm 0.3
7	SV	2CKW	<i>Caliciviridae</i>	3.081	3.103	3.894	2.079	1.594	2.627		4, 3.4 \pm 0.2

[§] El valor N corresponde al número de estructuras usadas para el alineamiento. El promedio que se indica en el valor correspondiente a los rmsd del alineamiento entre la RpRd de TaV y todas las enzimas de una familia viral específica, con su correspondiente desvío estándar (SD).

En el dominio carboxilo terminal de la estructura, se encuentra el lazo λ 6 (Figura 20) que por disposición y longitud se asemeja a la estructura empleada para la iniciación *de novo* de la polimerización por los miembros de la familia *Flaviviridae* descritos hasta el momento, como el virus de la hepatitis C (HCV) y el virus Dengue (DV), (Bressanelli y col. 2002; Selisko y col. 2012; Mosley y col. 2013). Con el objetivo de estudiar la importancia de esta estructura, se generó una proteína mutante donde se eliminó una porción del λ 6 (Δ 611-617). Los ensayos de polimerización *in vitro* demostraron que esta estructura no es indispensable para la polimerización. Por el contrario, su eliminación produce un aumento de la actividad polimerasa (Figura 20). Posiblemente este resultado se deba a la apertura de la cavidad central que facilitaría la salida del dsARN, recién sintetizado, por la cavidad central de la polimerasa (ver discusión).

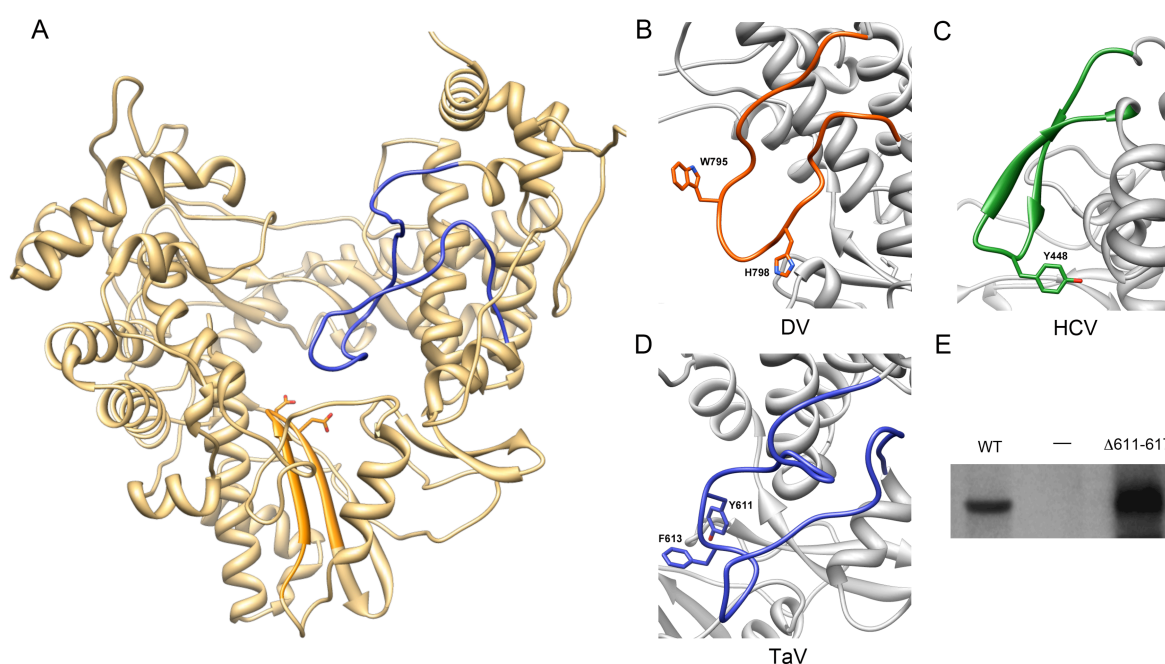


Figura 20. Homología estructural del lazo $\lambda 6$ de la RpRd de TaV. A) El dominio polimerasa del ORF1 de TaV posee un lazo (en azul) que ocluye parcialmente la cavidad central de la enzima y se dispone próximo al sitio activo (en naranja). Miembros de la familia Flaviviridae poseen RpRds con estructuras similares a este lazo, empleado para la iniciación *de novo* de la polimerización. El virus Dengue (B), posee un lazo con los residuos W795 y H798 como responsables de la interacción con la base del primer nucleótido añadido a la cadena de ARN sintetizada. El virus de la Hepatitis C (HCV) posee la T448 que cumple esa función (C). La RpRd de TaV posee los aminoácidos aromáticos Y611 y F613 cuyas cadenas laterales forman un ángulo recto, dispuestas en las proximidades del sitio activo (D). La eliminación del extremo del lazo $\lambda 6$ ($\Delta 611-617$), en donde se encuentran los residuos aromáticos, produce un aumento en la actividad polimerasa como se observó en los ensayos de polimerización *in vitro* (E). -, RpRd $\Delta 611-617$ en ausencia de ARN molde.

En la cavidad central del dominio polimerasa se encuentra la mayoría de la superficie electropositiva de la proteína (Figura 21). Como todas las polimerasas conocidas su estructura está atravesada por túneles que permiten la entrada del ácido nucleico molde, en este caso ssARN, y los nucleótidos que requiere durante la polimerización (Figura 21 B). Estos conductos se encuentran tapizados por aminoácidos con cargas positivas que facilitan la interacción con los grupos fosfatos de los sustratos de la polimerización. En regiones como estas se hallaron densidades electrónicas (hasta 4 por monómero) que se asignaron como iones SO_4^- provenientes de la condición de cristalización. Algunos de ellos se encuentran fuertemente anclados a la proteína, rodeados por una triada de residuos de arginina (R545, R564 y R269) o una combinación de argininas y lisinas (R280, R164 y K278). Otros iones se encontraban interaccionando más débilmente con la proteína. Este es el caso del ión próximo a la Y282 y la K264 o el que se asignó sobre las T443 y T444.

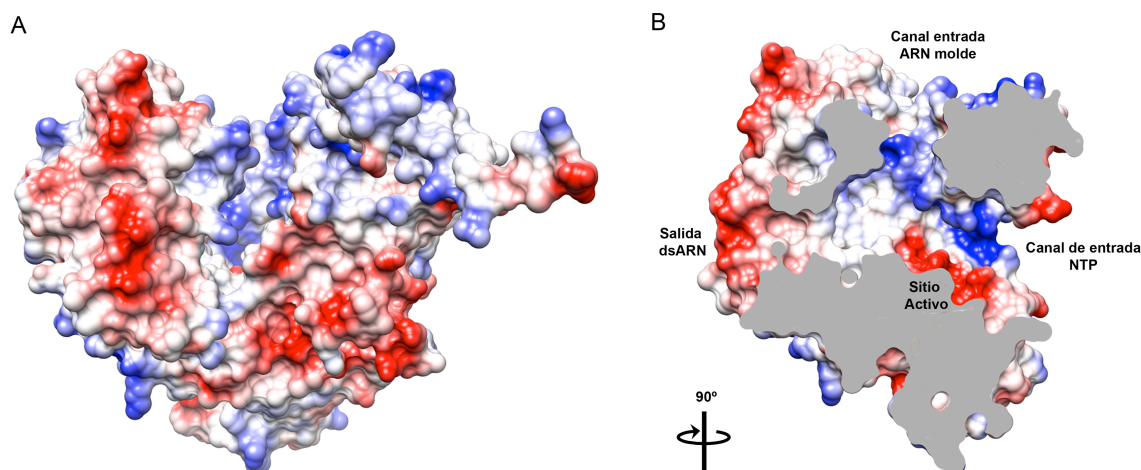


Figura 21. Distribución de cargas en la superficie del dominio RpRd del ORF1 de TaV. . (A) Vista frontal del dominio polimerasa como en la figura 2 en donde se ha coloreado la superficie cargada de la proteína, en donde se destaca la distribución de cargas Coulómbicas. Con rojo se indica las cargas negativas y en azul las positivas. (B) Sección de una vista lateral del dominio polimerasa en donde se destacan las cavidades de la enzima para la entrada del ssARN molde y de los nucleótidos .

Al centrar la atención en la unidad asimétrica, se observó la formación de un dímero por las interacciones recíprocas entre monómeros, específicamente entre (i) los extremos amino terminales y las cavidades centrales de la polimerasas (Figura 22) y (ii) los extremos carboxilos terminales con los laterales de la molécula vecina (Figura 22). Esta interacción sucede en la parte superior del subdominio de los dedos.

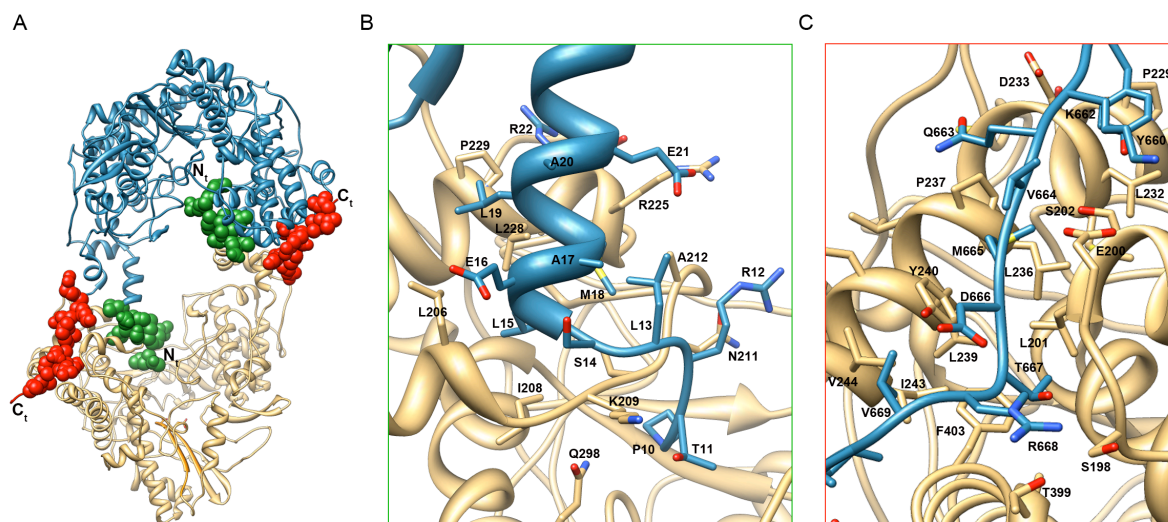


Figura 22. Formación del dímero del fragmento cristalizado del ORF 1 de TaV en los cristales. A) La estructura cristalográfica de la RpRd de TaV permite ver que aminoácidos de los extremos amino (representado en bolas verdes) y carboxilo terminal se encargan de mantener la estructura dimerica de la polimerasa. B) Detalle de las interacciones del extremo amino terminal de la molécula B (azul) con la cavidad central de la molécula A (marrón). C) Detalle de las interacciones entre el extremo carboxilo terminal de la molécula B y el lateral de la molécula A.

La cadena B involucra 74 residuos y la A 77 residuos en esta interacción lo que representa alrededor de un 11% de los residuos en la superficie de la proteína. Mayoritariamente las interacciones que mantienen esta unión son puentes de hidrógeno.

Según el análisis de la superficie de contacto entre las dos moléculas mediante el programa PISA (Krissinel y Henrick, 2007), dichas interacciones estabilizan el dímero ($\Delta G_{\text{diss}} = 46.3$ kcal/mol) con una superficie total de 6038 \AA^2 .

La interacción del extremo amino terminal (Figura 22 B) involucra 38 residuos, que cubren un área de 2725 \AA^2 con un $\Delta G_{\text{diss}} = 16.5$ kcal/mol, que implica la formación de 21 puentes de hidrógeno y un puente salino. Por otra parte, la interacción del extremo carboxilo (Figura 22 C) terminal se construye con 43 residuos en un área de interfase total de 3313 \AA^2 , con un $\Delta G_{\text{diss}} = 17.2$ kcal/mol. En esta zona existen 25 puentes de hidrógeno.

Los valores energéticos antes mencionados, implican que el contacto del extremo amino terminal, con la cavidad central requiere menos energía que el del carboxilo terminal para disociarse. Esto se traduce en una flexibilidad del extremo amino para salir de la

cavidad como se ha comprobado por comparación de distintas estructuras de la RpRd de TaV, casi todas ellas presentadas en esta memoria (Figura 23). El extremo amino terminal de un monómero no solo se encuentra enclavado en la cavidad central de una molécula vecina sino que además los primeros nueve residuos, no visibles en la estructura cristalográfica, podrían estar interaccionando con el sitio activo (Figura 23). La eliminación de la cola de histidinas y el brazo espaciador de la proteína recombinante mediante su corte con la proteasa TEV, no permitió asignar más aminoácidos del extremo N-terminal (datos no mostrados).

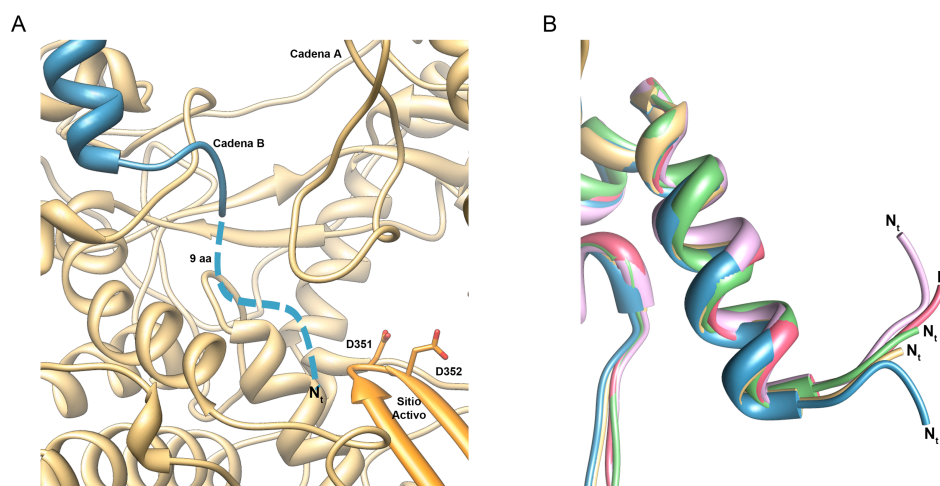


Figura 23. Interacción del extremo amino terminal de la RpRd de TaV. Los primeros 9 aminoácidos de la proteína viral no se observan en la estructura cristalográfica, pero podrían estar interaccionando con el sitio activo ya que tan solo 20Å separan la P10 (el primer aa visible en la densidad electrónica) de los residuos aspárticos catalíticos (A). La flexibilidad del extremo amino terminal se ve representada en las múltiples orientaciones que presenta esta porción de la proteína en las estructuras resueltas, orientando los primeros aminoácidos hacia la cavidad central de la enzima o alejándola de ella (B).

Para evaluar el papel funcional del extremo amino terminal en la actividad de la RpRd de TaV se empleó un mutante de la proteína que carecía de los primeros 27 aminoácidos del extremo amino terminal ($\Delta 27$). Tras eliminar la cola de histidinas mediante el corte con la proteasa TEV, se comparó su actividad polimerasa *in vitro* con la del ORF1 entero (Figura 24).

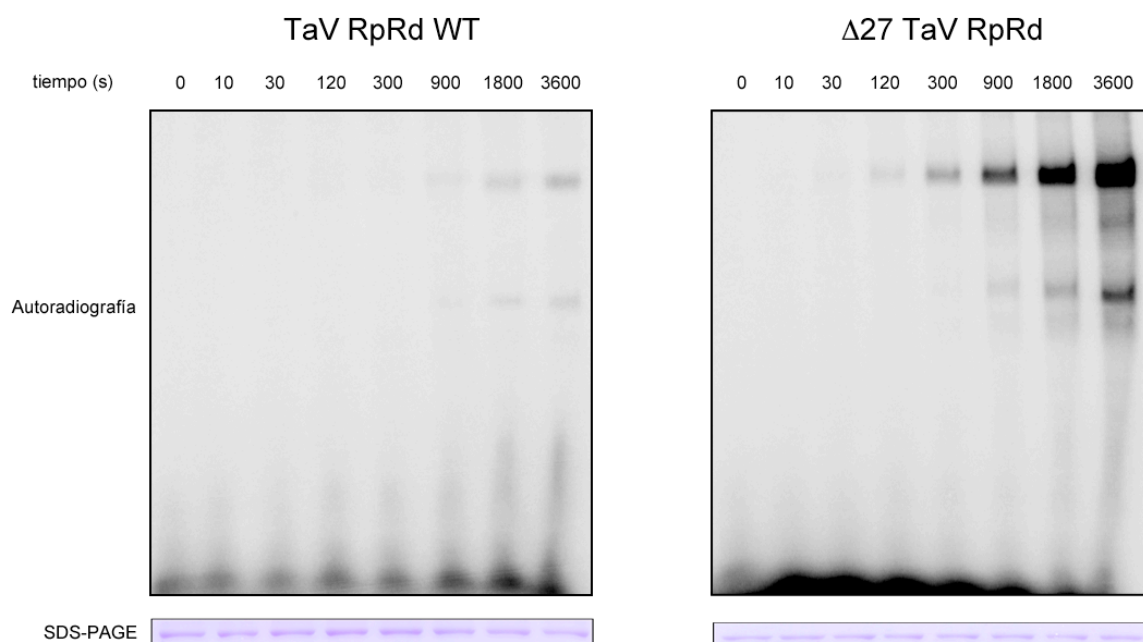


Figura 24. Cinética comparativa de la actividad polimerasa del ORF1 de TaV. Imágenes de la pantalla de captura radiactiva (*Phosphorimager*) de un PAGE 7% revelada tras 24 hs de exposición con los resultados de las cinéticas de polimerización sobre el ssARN con la secuencia del UTR3' del virus. El ORF1 de TaV WT de 140 kDa que comprende el dominio RpRd posee menos capacidad de polimerización que su homóloga mutante carente de los 27 aa del extremo amino terminal ($\Delta 27$ TaV RpRd). En la parte inferior se muestran las imágenes de un SDS PAGE 11% tenido con azul de *Coomassie* como control de carga de las proteínas.

La eliminación de los primeros 27 aminoácidos, que como se demostró en el apartado de purificación de proteínas impide la formación del dímero, también permite que la polimerasa sea más activa (Figura 24). En la comparación de las cinéticas de estas proteínas se observa que la versión mutante $\Delta 27$ es capaz de iniciar la reacción de polimerización antes que la RpRd WT. Esto indica que el extremo amino terminal está bloqueando la correcta disposición de alguno de los sustratos y/o su entrada en la cavidad central. En este experimento también se observa que la polimerización del ssARN molde con el UTR 3' del virus, es diferente a la obtenida para el fragmento de 75 kDa del ORF1. Las proporciones del fragmento ARN polimerizado con respecto al ARN entero varían con respecto a lo observado para ese fragmento (Figura 11). Con el fragmento de ORF1 la polimerización era incompleta, mientras que en el caso del ORF1 WT (Figura 24) el UTR entero se sintetiza en una cantidad equivalente al fragmento de ARN incompleto. En el caso de la versión mutante $\Delta 27$ esta proporción se inclina por el UTR entero como producto de polimerización (Figura 24).

4.3.1.3. Estructura de la RpRd de TaV (holoenzima) en complejo con nucleótidos

Los intentos de embeber los cristales del fragmento del ORF1 de TaV en soluciones con diferentes rNTPs no funcionaron, debido a que esta manipulación destruía la integridad de los cristales. No obstante la co-cristalización de CTP/Mg²⁺ con la proteína, si condujo a la obtención de cristales que difractaron a alta resolución.

La estructura resuelta y refinada a 2.25 Å de resolución (Tabla 4) muestra una densidad extra atribuible a la presencia de una molécula de CTP unida a una zona de la polimerasa no esperada. Esta densidad se localizó en las dos moléculas de RpRd que forman la unidad asimétrica, ocupando la cara interna del subdominio del pulgar, a unos 30 Å del sitio activo (Figura 25 A). En esta posición, la molécula de CTP interacciona con los aminoácidos M556, T560 y D563 de la $\alpha 19$ y E601 de la $\alpha 21$.

En el CTP ubicado en la cadena A de la proteína se pueden observar con claridad dos (α y β) de los tres grupos fosfato, aunque estos se han refinado con una ocupación mas baja (0.8) que el resto de la molécula (Figura 25 A).

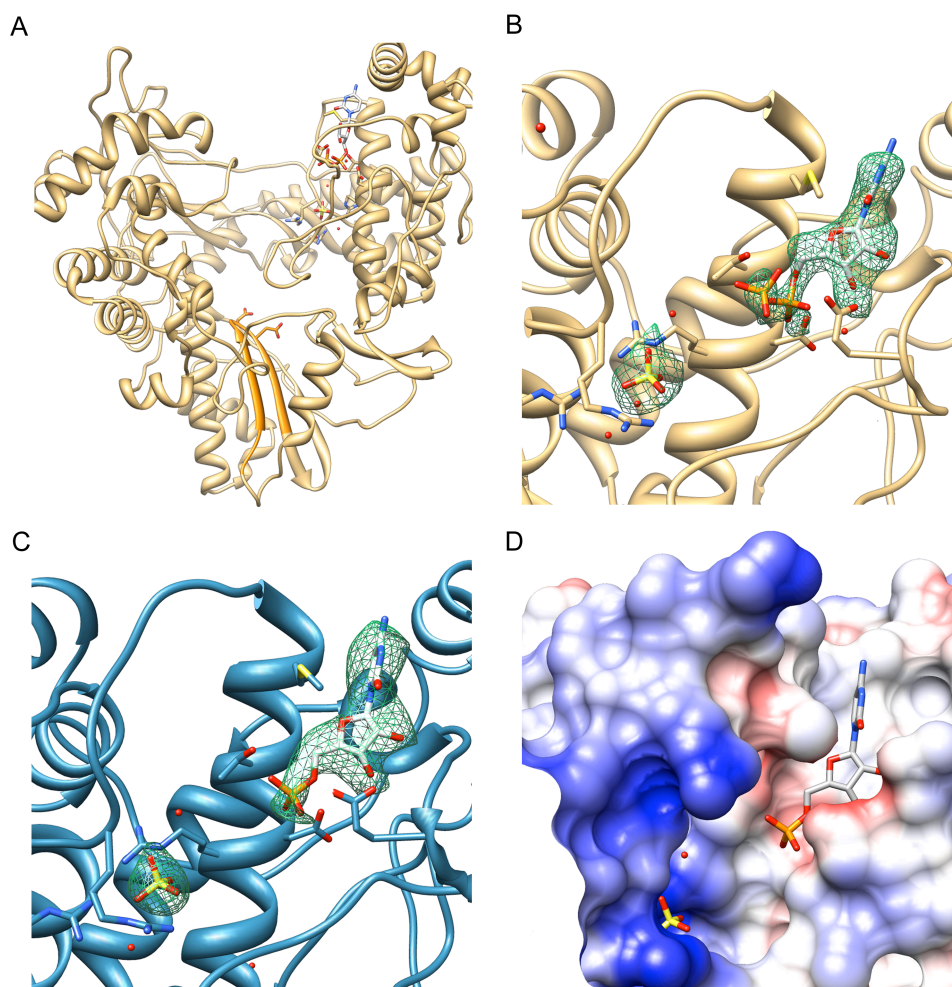


Figura 25. Estructura de la RpRd de TaV en complejo con CTP/Mg²⁺. A) Vista global de la ubicación de una de las moléculas de CDP sobre la cadena A de la polimerasa. B) Detalle de la región donde se observa densidad electrónica asignada a una molécula de CDP sobre la cadena A y uno de los iones sulfatos interaccionando con una triada de argininas. La malla verde representa un corte del mapa de densidad electrónica (2Fo-Fc) con un contorno de 2σ . C) Detalle de la misma región en la cadena B del dímero de la RpRd. La densidad para este ligando solo permitió asignar hasta el fosfato α del nucleótido, siendo modelado un CMP. D) Detalle de la superficie electrostática de la cadena B de la proteína en la región de interacción con el nucleótido. En azul, se muestra la superficie con carga positiva y en rojo la superficie con carga negativa.

Del nucleótido unido a la cadena B solo se pudo asignar el fosfato α . Estos resultados indican la flexibilidad esta zona del CTP que no se encuentra interaccionando con ninguna superficie electropositiva que otorgue rigidez a la rotación de los enlaces. Cabe destacar que ambos nucleótidos se encuentran próximos a una región electropositiva, formada por los residuos R564, R545 y R269, donde también se encontró una densidad extra que se asignó a una molécula de sulfato que provenía de la solución de cristalización (Figura 25 B).

4.3.1.4. Estructura de la RpRd de TaV (holoenzima) en complejo con ssARN

El dominio polimerasa se cristalizó en presencia de un molde ssARN de 27 nt de longitud, pero en la estructura resuelta (Tabla 4) solo se observó densidad electrónica ordenada para posicionar una cadena de 4 nt (5' CCUG 3'), en cada uno de los monómeros de la unidad asimétrica, ocupando el canal de entrada del RNA molde (Figura 26 A, B). Este canal electropositivo se sitúa en la cara interna del dominio de los dedos de la polimerasa. En esta estructura las bases del tetranucleótido identificado se encuentran expuestas al solvente, sin apilamiento hacia el centro del canal (Figura 26 C).

El extremo 5' del ssARN interacciona con distintos residuos situados en la entrada del canal. En particular la cadena principal del residuo S215 y, las cadenas laterales Y282 y K264 forman puentes de hidrógenos con el ácido nucleico (Figura 26 E). En esta estructura, el extremo 3' del ssARN no aparece orientado hacia el centro activo, la base aceptora (t+1) se encuentra rotada, interaccionando con los residuos T443 y T444 del motivo B que forman la base de este canal. Por otro lado, el esqueleto de azúcar fosfato contacta con las cadenas laterales T210, K224, S294 y Q298 de la molécula A y la R12 de la molécula B (Figura 26 D).

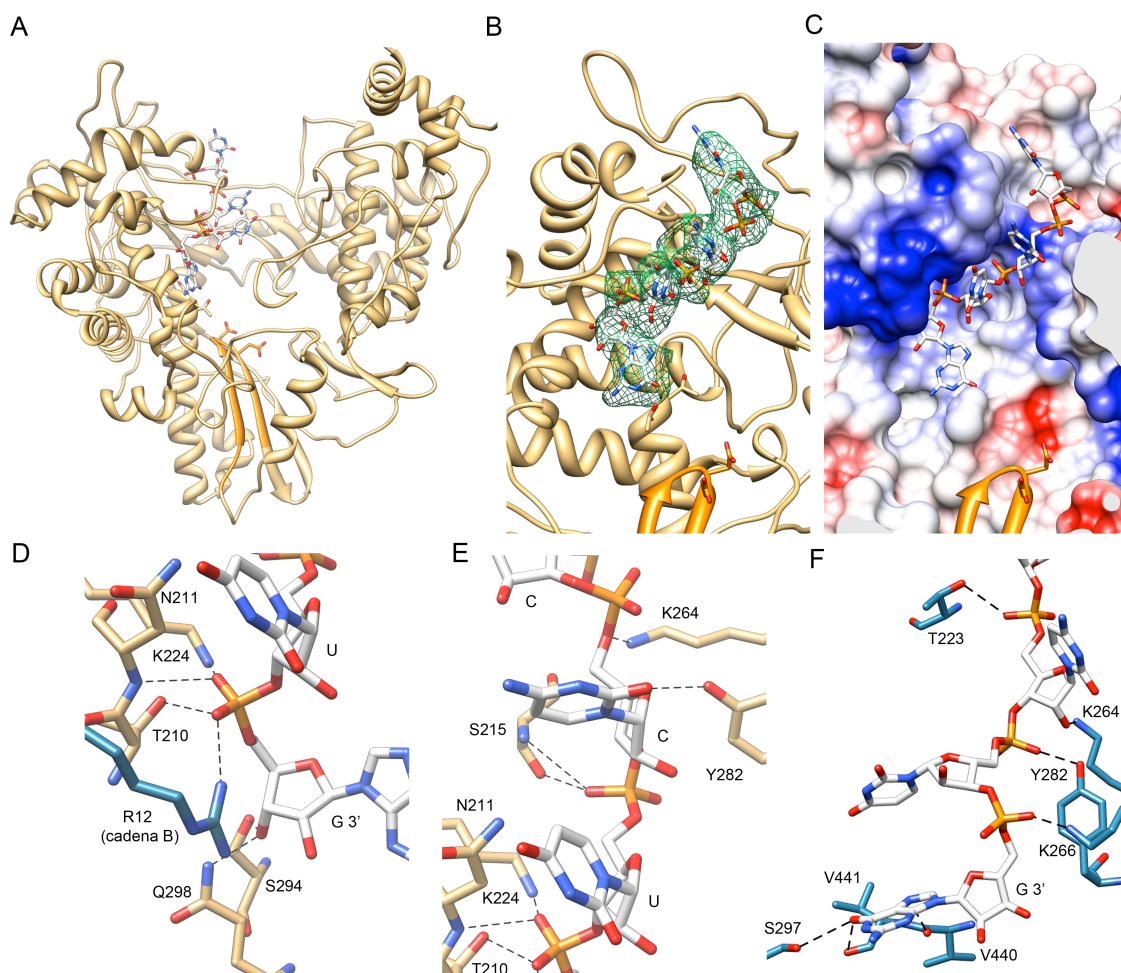


Figura 26. Complejo RpRd-ssARN. A) Vista de la ubicación del oligonucleótido en la cadena A del dímero de la polimerasa de TaV. En naranja se destaca el motivo C del sitio activo. B) Mapa de densidad electrónica que permitió asignar 4 nts (5' GUCC 3') en la cadena A de la RpRd de TaV. C) Coloreado de las cargas coulombicas sobre la superficie del molde sobre la cual se posa el oligonucleótido. Las interacciones que mantienen el extremo del ssARN con la cadena A se muestran en el panel D (extremo 3' del ARN) y E (extremo 5' del ARN). Los contactos de la cadena B con el ssARN se muestran en el panel F.

La orientación y también los contactos que establece el ARN molde con la molécula B son distintos de los observados para la molécula A, aunque se mantienen algunas interacciones (Figura 26 F). En ambos complejos A y B, los residuos T443 y T444 interaccionan con los nucleótidos 3' del ssARN molde (Figura 27). Aunque la orientación de la base (G) es considerablemente distinta en los dos complejos.

Como se ha descrito en la bibliografía, el motivo B que contiene residuos de Ser/Thr estrictamente conservados (Lang y col. 2013; Garriga y col. 2013), se halla en las proximidades del sitio catalítico (motivo C) y está involucrado en el correcto posicionamiento del ARN molde. Para analizar su importancia en la actividad RpRd de TaV, se sustituyeron los residuos T443 y T444 por alanina y se analizó *in vitro* la actividad de la polimerasa mutada. Tal como se demuestra en la Figura 27 C, estas sustituciones eliminaron la actividad de la enzima, demostrando su importancia en la polimerización.

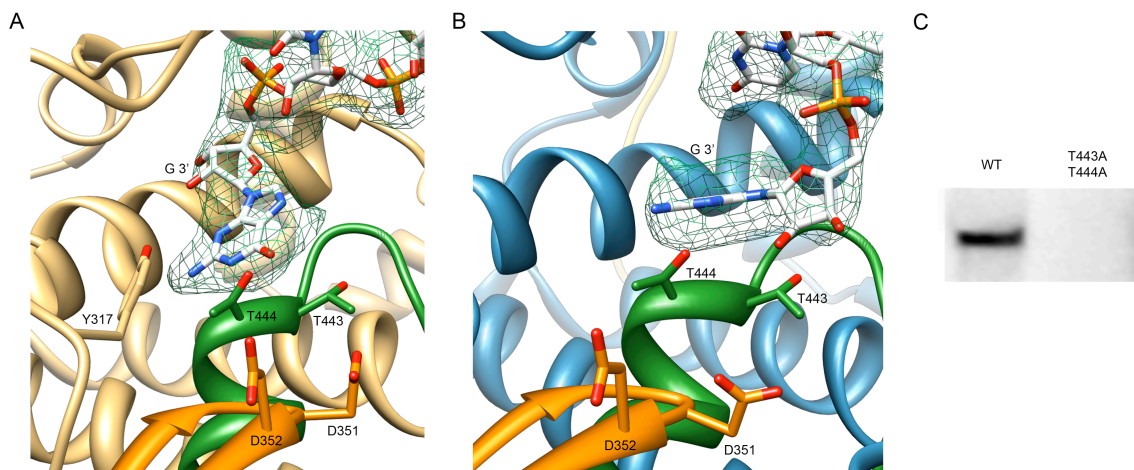


Figura 27. Interacción del ssARN con la base del canal para el ARN molde. Detalle de la interacción de los residuos de Thr444 y 443 del motivo B (en verde) con el extremo 3' del ssARN en la cadena A (A) y B (B). El motivo C del sitio activo frente al motivo B se indica en naranja, en donde se muestran sus residuos aspárticos catalíticos. La red verde representa el mapa de densidad electrónica del ARN. C) Revelado en la pantalla de captura radiactiva del ensayo de polimerización *in vitro* de las RpRd WT y la mutante T443/444A sobre un ssARN con la secuencia del UTR3' de TaV.

4.3.1.5. Estructura de la RpRd de TaV (holoenzima) en complejo con ssARN (15nt) + NTPs

En el cristal obtenido tras la incubación de la proteína con ssARN molde (15 nt), Mn^{2+} , GTP y CTP, no se observó densidad electrónica ordenada para posicionar el ssARN. Sin embargo, se observaron densidades extra próximas a la cavidad del centro activo que pudieron ser interpretadas como nucleótidos. En uno de los casos el nucleótido se encuentra sobre el sitio activo de la cadena B de la RpRd de TaV (Figura 28 A). La base del GTP se ubica en la cercanía de los residuos Y611 y F613 del lazo $\lambda 6$ (*Priming loop*), mientras que el fosfato γ del nucleótido interacciona con las cadenas laterales de los residuos R280, K278 y K488, que forman parte del motivo F.

Sobre el residuo de T444 en la cadena A se observó una densidad electrónica voluminosa conectada con la densidad del residuo. Esta densidad se interpretó como una molécula de GMP formando un enlace covalente entre el fosfato α del nucleótido y el oxidrilo de la cadena lateral de la T444 en el motivo B (Figura 28 A). Este tipo de modificación con nucleótidos de las RpRds ha sido descrita previamente como un mecanismo para la iniciación *de novo* en las polimerasas de los Birnavirus IBDV e IPNV (Xu y col. 2004; Pan y col. 2007; Pan y col. 2009; Graham y col. 2011).

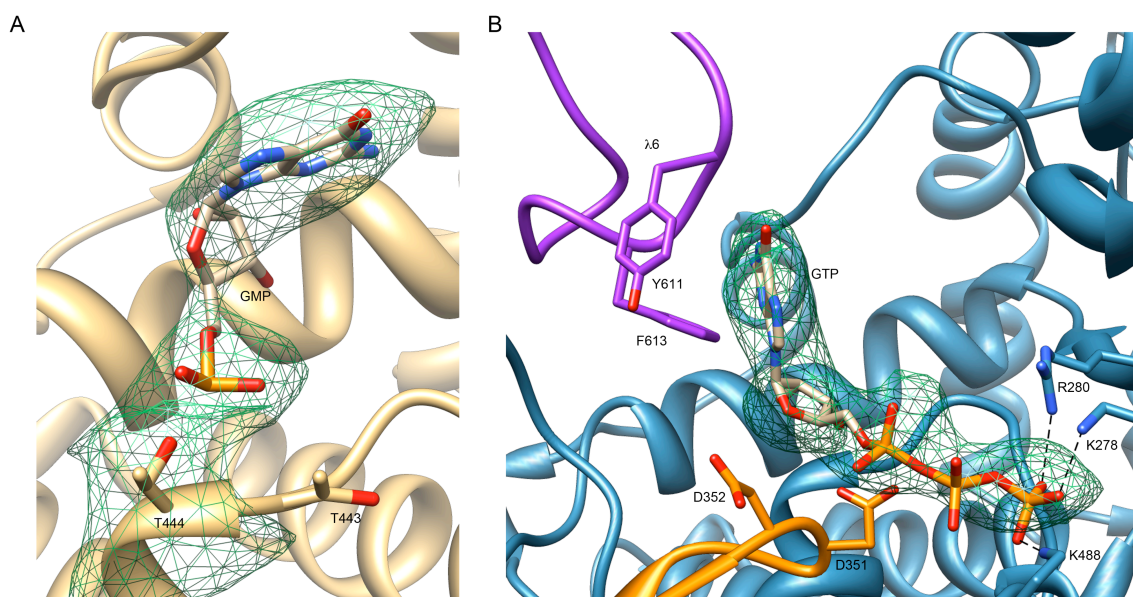


Figura 28. Nucleótidos en la estructura de la RpRd de TaV en presencia de ssARN molde y Mn^{2+} . A) Durante la incubación de la proteína con el ARN molde y el ión, la polimerasa modificó covalentemente el residuo de T444 de la cadena A con un GMP unido por el fosfato α . B) Ubicación de una molécula de GTP sobre el sitio activo (naranja) de la cadena B (azul). Es destacable la orientación de la base del GTP hacia los residuos hidrofóbicos (Y611, F613) del lazo $\lambda 6$ (violeta) y la interacción del fosfato γ con los residuos básicos próximos al sitio activo.

En este momento se están llevando a cabo experimentos con espectrometría de masas para confirmar la modificación covalente observada en el cristal.

La modificación covalente del residuo T444 bajo las condiciones de polimerización *in vitro*, no concuerda con lo predicho en la bibliografía (Zeddarn y col. 2010) como el sitio de la modificación, la T157. Para comprobar el posible papel de este residuo sobre la actividad de la enzima, se sustituyó por un residuo de alanina. La misma mutación se realizó sobre el residuo S2, que es potencialmente accesible a la proximidad del sitio activo. Con ambas versiones mutantes se realizaron ensayos de polimerización *in vitro* y no se observaron cambios con respecto a la actividad de la proteína WT. Estos resultados muestran la irrelevancia de la T157 y de la S2 en la actividad polimerasa, pero no descartan su posible modificación covalentemente, dado que no se ha podido demostrar *in vitro*.

4.3.1.6. Comparación de las estructuras de la polimerasa aislada y en complejo con ssARN

Las moléculas que forman el dímero de la polimerasa en complejo con ARN, presentan algunos cambios conformacionales debido a la presencia de ARN en su interior:

(i) cambio de la posición entre dímeros y de la (ii) cambios en la interacción del extremo amino terminal con la cavidad central.

En el dímero que forma la unidad asimétrica existe un cambio en la superficie de interacción del extremo amino y carboxilo terminal, lo que produce un desplazamiento de 7 grados de una de las moléculas del dímero con respecto al eje horizontal de la molécula nativa (Figura 29). El cambio conformacional en el extremo amino, que produce la reorientación de la cadena principal hacia el exterior de la cavidad central, disminuye los impedimentos estéricos para el ssARN se posicione en el interior de la cavidad.

También en el monómero de la polimerasa se observan cambios que corresponden con una abertura de la cavidad central levemente. El cambio conformacional es apreciable en este caso, tras el alineamiento estructural de las hélices que forman el subdominio de los dedos (Figura 29).

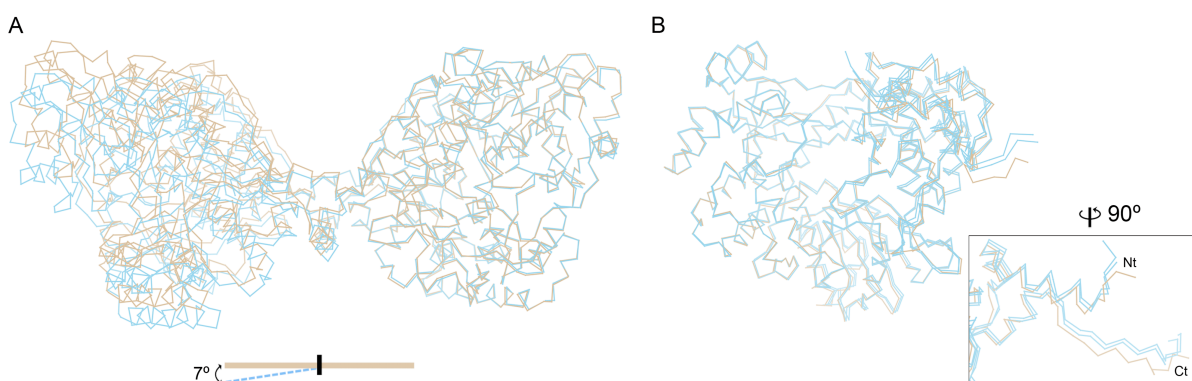


Figura 29. Alineamiento estructural de la polimerasa de TaV como apoenzima y holoenzima. A) Una de las moléculas que forma el dímero de la polimesa en complejo con ssARN (celeste) presenta una rotación de 7° con respecto al dímero de la polimerasa como apoenzima (marrón). B) el monómero de la polimerasa presenta una sutil apertura de la cavidad central como se puede ver en el alineamiento de las hélices en el motivo de los dedos. En el cuadro inferior se destacan las conformaciones que adoptan los extremos de la proteína en la estructura de apoenzima (marrón) y en ambas cadenas de la holoenzima. En la estructura en complejo con ARN, la orientación del extremo amino terminal apunta hacia el exterior de la cavidad de la polimerasa.

4.3.2. Caracterización estructural del ORF1 de TaV por microscopía electrónica

Si bien se pudo obtener la proteína correspondiente al ORF1 completo a partir de dos sistemas de expresión diferentes, en ninguno de los casos se pudo obtener un cristal a partir de las mismas. Tampoco se pudo obtener una construcción del dominio carboxilo terminal

del ORF1 soluble que permitiera su posible cristalización. Debido a ello, se decidió abordar el estudio estructural de la proteína completa mediante una técnica alternativa: el análisis de partículas individuales a partir de imágenes de microscopía electrónica de muestras de proteína purificada. Se analizaron tres muestras de proteína: (i) el dominio cristalizado de la polimerasa, (ii) el ORF1 completo 140 kDa obtenido a partir de células de mamífero infectadas con VV-TaV ORF1 y (iii) la versión mutante $\Delta 27$ de la proteína con contiene una deleción de los primeros 27 residuos amino terminales (para aprovechar su dominio carboxilo terminal intacto y su estado monomérico)

3.2.1. Reconstrucción 3D del dominio cristalizado del ORF1 de TaV.

La visualización directa de imágenes de microscopía electrónica con tinción negativa, del fragmento purificado de la RpRd de TaV (75 kDa), mostró dos poblaciones de partículas (Figura 30 A). En una de ellas, las partículas poseen morfología y dimensiones compatibles con las esperadas para un dímero de la proteína, como el observado en los cristales. La otra población, presenta un menor tamaño, compatible con las esperado para un monómero de la polimerasa.

Mediante procesamiento digital de imágenes y 3DR de las partículas de menor tamaño, se generó un mapa de densidad que fue calculado a partir de 2576 imágenes con una resolución de 27 Å en base a los criterios de FSC 0.5 (Figura 30 B).

El volumen tridimensional obtenido presenta la forma de una mano derecha semicerrada con el dedo pulgar extendido. El modelo tiene una longitud mayor de 92 Å, una altura de 60 Å y una anchura de 80 Å con una pronunciada concavidad en la región de la palma (Figura 30 B).

El ajuste de la estructura atómica del dominio polimerasa en la densidad obtenida muestra una excelente superposición entre ambas (Figura 30 C). Los extremos de los dominios amino y carboxilo terminal se sitúan en las densidades correspondiente a los dedos y el pulgar de la mano, respectivamente; mientras que la cavidad central de la polimerasa coincide con la concavidad del volumen alrededor del cual se ubica el resto de la estructura de la proteína. Pese a la gran coincidencia, la estructura cristalográfica no justifica toda la densidad observada en el mapa de microscopía (Figura 30 C, indicada con una flecha) . Esta observación concuerda con lo esperado, ya que los 34 aminoácidos del

extremo amino terminal de la proteína recombinante no son visibles en la estructura cristalográfica.

Por otra parte, se realizó una 3DR de las partículas de mayor tamaño a partir de 3819 imágenes con una resolución de 23 Å según los criterios de FSC 0.5 (Figura 30 C). El tamaño y morfología del modelo de densidad es compatible con un dímero del dominio RpRd de TaV como el que se observó en la estructura atómica. El ajuste entre los modelos cristalográficos y de microscopía electrónica demuestra la compatibilidad entre ambas estructuras (Figura 30 C).

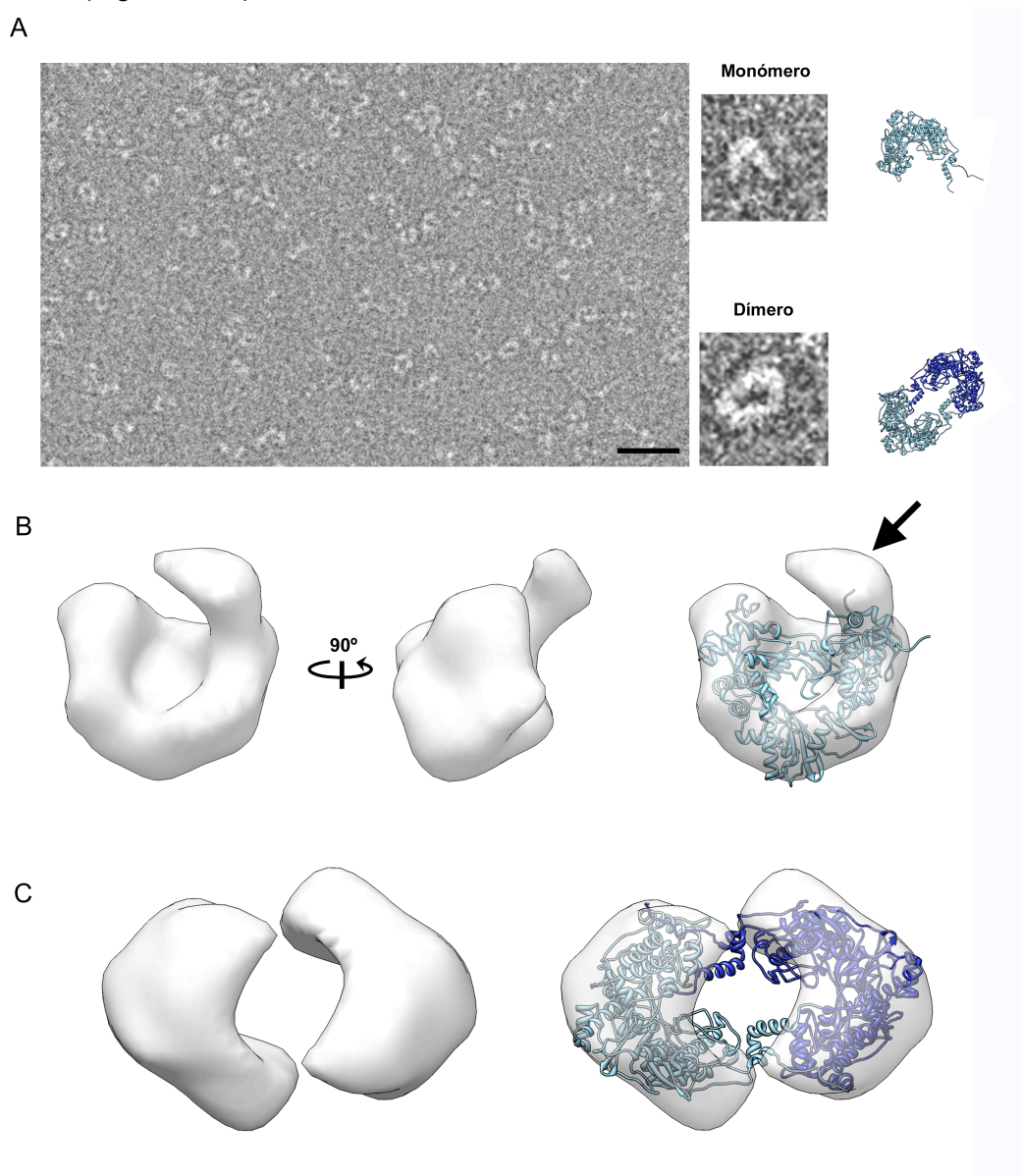


Figura 30. Reconstrucciones tridimensionales del dominio RpRd de TaV. A) Sección de una micrografía electrónica de la purificación del dominio polimerasa purificado y teñido con acetato de uranilo 2% (p/v). La barra de escala indica 3 nm. En los recuadros laterales se destacan algunas de las partículas individuales identificadas como monómero o dímero y su comparación con las mismas estructuras obtenidas por rayos X. B) Galería de la reconstrucción tridimensional obtenida para el monómero de la RpRd de TaV y su ajuste con la estructura cristalográfica. Con una flecha se indica la porción de densidad que el modelo atómico no puede rellenar. C) Reconstrucción tridimensional de un dímero de la polimerasa y su ajuste con el modelo atómico.

4.3.2.2. Reconstrucción 3D del ORF1 de TaV con el extremo C-terminal completo

La caracterización estructural de las muestras se llevó a cabo mediante el análisis por microscopía electrónica de las proteínas purificadas teñidas negativamente. La visualización directa de las imágenes correspondientes al ORF1 completo y a la versión mutante $\Delta 27$, muestra una población homogénea de partículas cuyas morfologías (distinta a la observadas en la muestra del fragmento de 75 kDa), eran compatibles con el tamaño esperado para monómeros de las proteínas (Figura 31 A). Es posible observar en los campos de las micrografías partículas asimétricas con forma de letra “G” (Figura 31 B).

Dada la disponibilidad y calidad de la proteína purificada del mutante $\Delta 27$, y la dispersión homogénea de la proteína en sobre el campo de la imagen, se decidió abordar las 3DRs empleando esta proteína antes que la del ORF1.

Mediante visualización directa y procesamiento digital de imágenes y 3DR, se generó un mapa de densidad de la proteína delecionada en el extremo amino terminal pero con el dominio C-terminal intacto. El modelo final se calculó a partir de 6752 partículas a una resolución de 24 Å en base al criterio de FSC = 0.5 (Figura 31 C).

En el volumen final reconstruido se pueden observar dos grandes densidades conectadas. La mayor de ellas, coincide con el volumen obtenido para el monómero del dominio polimerasa previamente descrito (Figura 31 B). La menor de las densidades, es globular ligeramente aplanada y curvada, se halla enfrentada a la región cóncava de la densidad mayor.

La estructura cristalográfica presenta un excelente ajuste con la mayor de las densidades sobre el modelo de microscopía electrónica (Figura 31 C), atribuyendo la posición del dominio polimerasa dentro del modelo tridimensional de la mutante $\Delta 27$. El resto de la densidad debe pertenecer al C-terminal de la proteína. Sin embargo, teniendo en cuenta que el dominio RpRd cristalizado, con ~700 aa, ocupa la densidad mayor; el C-terminal de unos ~500 aa debiera ocupar un volumen mayor al que se le puede atribuir en el modelo de microscopía electrónica. Por lo tanto, habiendo verificado bioquímicamente la integridad de la proteína, es posible que la falta densidad en el modelo se deba a la falta de rigidez de una porción del extremo carboxilo terminal. Esto provocaría una pérdida de información durante el promediado de las imágenes.

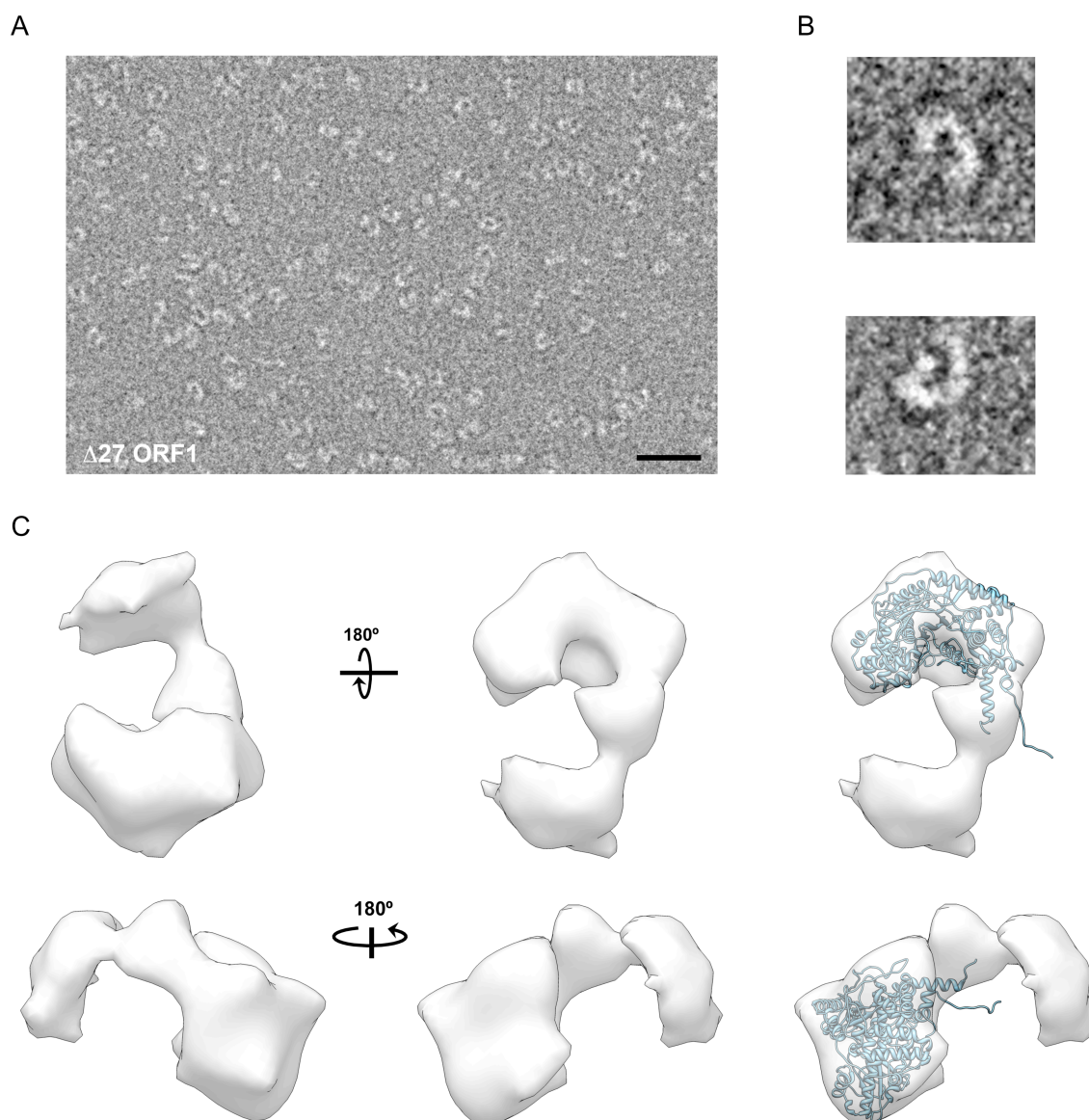


Figura 31. Reconstrucciones tridimensionales de la proteína $\Delta 27$ ORF1 de TaV. A) Imagen de una micrografía electrónica de la purificación de la mutante $\Delta 27$ ORF1 de TaV, teñida con acetato de uranilo 2% (p/v). La barra de escala indica 3 nm. B) Detalle de alguna de las partículas individuales identificadas como monómeros de la proteína en las imágenes con tinción negativa. C) Galería del modelo de densidad obtenido para el $\Delta 27$ ORF1 y su ajuste con la estructura cristalográfica.

No obstante esta reconstrucción permite mostrar la ubicación del D1 (RpRd) del ORF1 de TaV y la de parte del D2 (región carboxilo terminal).

4.4 Microscopía confocal de fluorescencia del ORF1 de TaV expresada en células de insecto

4.4.1. Expresión transitoria de la RpRd de TaV

Con el objetivo de caracterizar la distribución subcelular tanto la proteína ORF1 completa como de diferentes variantes de ésta, los genes correspondientes se clonaron en el plásmido pLEX-2.1 bajo el control transcripcional del promotor ie-1 del virus de la poliedrosis de *Autographa californica* (AcNPV) (Figura 32 A). Los plásmidos resultantes se emplearon para expresar las diferentes proteínas de manera transitoria (ver MyM) en células de insecto Hi5. Para facilitar la identificación de las diferentes proteínas mediante técnicas de inmunomarcaje, las diferentes construcciones incluían una cola de histidinas en su extremo N-terminal de y/o un epítipo Flag en su extremo C-terminal.

Las diferentes construcciones expresaron con éxito en (Figura 32 B) alcanzando el máximo nivel de acumulación de proteína a las 96 horas post-transfección (h p.t.). Es destacable que, en oposición a lo observado con rBVs, las construcciones correspondientes a la proteína completa producida mediante transfección permanecen intactas sin degradaciones aparentes cuando se emplean estas condiciones de expresión (Figura 32 B. De forma similar, las diferentes versiones mutantes de la polimerasa y de los dominios N- (D1, aa 1-657) y C-terminales de la proteína codificada por la ORF1 (D2, aa 658-1257) aislados, se expresaron sin sufrir una degradación apreciables.

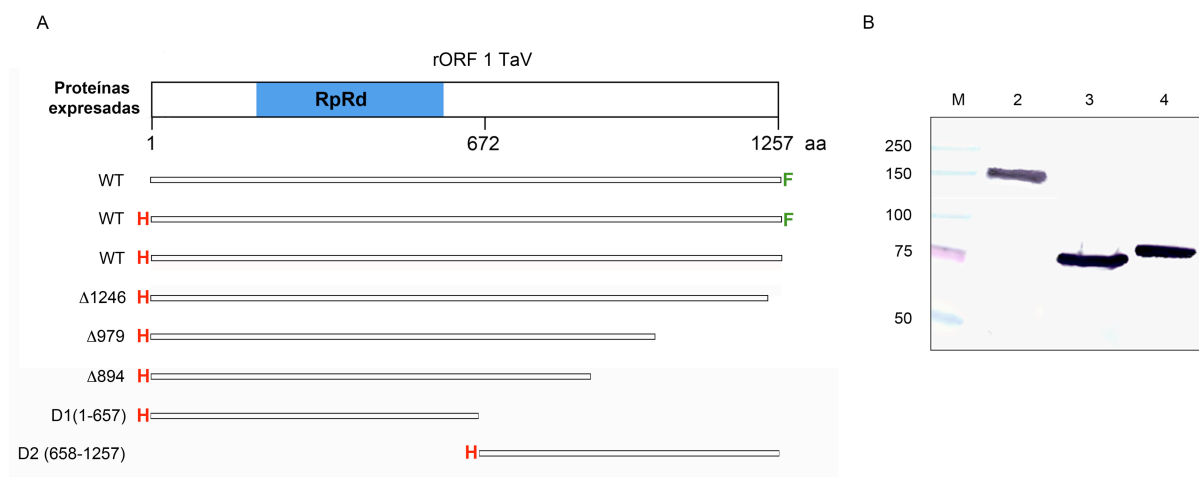


Figura 32. Expresión del ORF1 de TaV en células de insecto con el vector pLEX-2.1. A) Construcciones del ORF1 de TaV clonadas en el vector pLEX-2.1. Al ORF1 completa con una repetición de 6 histidinas (H, en rojo) en el extremo amino terminal y/o un epítipo Flag (DYKDDDDK) en el extremo carboxilo terminal (F, en verde) y los dominios amino y carboxilo terminal del ORF1 precedidos por repeticiones de 6 histidinas. B) WB anti histidinas y anti Flag de lisados celulares luego de 96 hpt con las distintas construcciones en el vector de expresión transitoria. Carriles 1: MwM, 2: pLEX-2.1-His-ORF1-Flag, 3: pLEX-2.1-His-D1TaVRdRp, 4: pLEX-2.1-His-TaVRdRpD2.

4.4.2. Distribución subcelular y cinética de acumulación de la RpRd de TaV en células Hi5

La visualización mediante microscopía de fluorescencia confocal del epítipo Flag localizado en el extremo C-terminal de la ORF1 de TaV (ORF1-Flag), reveló que la polimerasa posee una distribución exclusivamente citoplasmática difusa, preferentemente perinuclear (Figura 33). Si bien la distribución se mantiene, el patrón observado varía con el tiempo. A las 24 h post-transfección (p.t.) se observaron estructuras punteadas distribuidas en el citoplasma celular (Figura 33 A). A partir de las 48 hpt se observó la presencia acumulaciones de proteína en el contorno de estructuras con aspecto globular (Figura 33 B) que a tiempos tardíos (72 y 96 h p.t.) da lugar a acumulaciones aparentemente huecas de un diámetro comprendido entre 0,5 y 5 μm . Esta observación sugiere una posible ubicación de la proteína con algún compartimento membranoso.

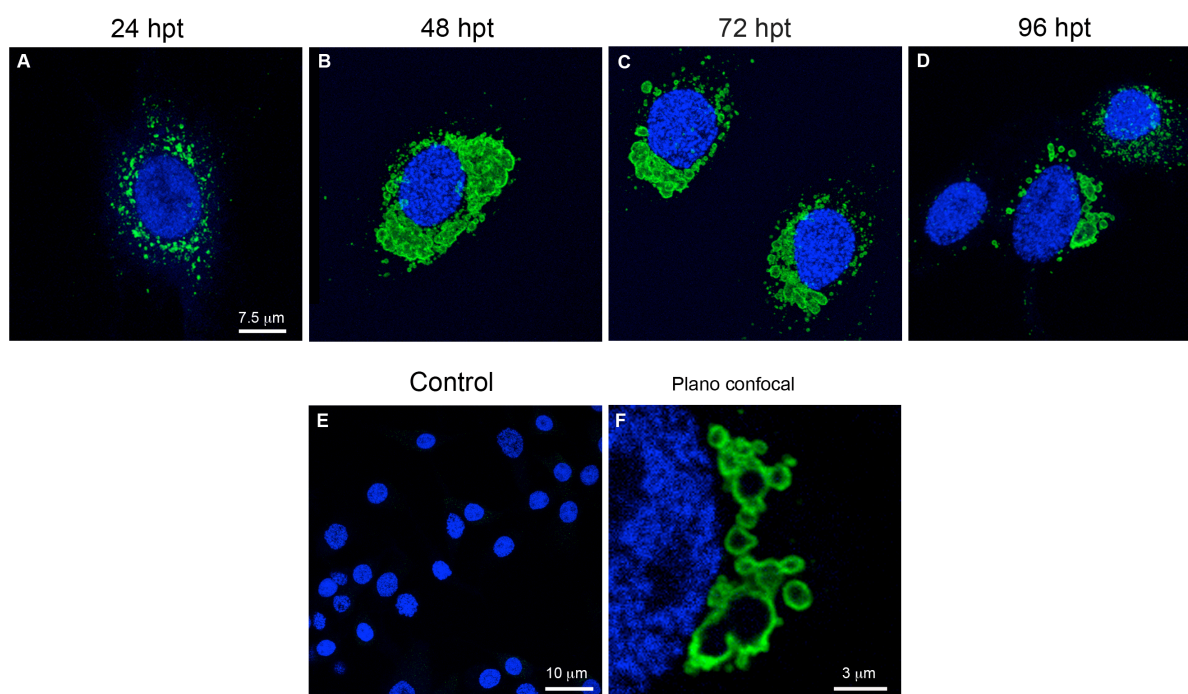


Figura 33. Cinética de expresión del ORF1 de TaV en células de insecto. El patrón de expresión del ORF1 de TaV se siguió en el tiempo luego de transfectar las células de insecto con el vector pLEX-2.1-TaVRpRd-Flag (panel A-D). La polimerasa se visualizó por inmunofluorescencia indirecta (Alexa 488, verde) contra el epítipo Flag en su extremo carboxilo terminal y se tiñeron los núcleos con DAPI (azul). E) Control negativo. F) Corte confocal y magnificación de la sección recuadrada del panel D en donde se destaca que la RpRd de TaV se encuentra en la superficie de las estructuras globulares huecas.

El marcaje diferencial de los extremos amino y carboxilo terminal del ORF1 de TaV (His-ORF1-Flag) con anticuerpos α -His y α -Flag no logró diferenciar una ubicación preferente de los dominios hacia uno de los lados del contorno de las estructuras globulares descritas. En algunos casos se detectó una marca difusa del epítipo Flag en el contorno interno de las vesículas (Figura 34). No obstante la reconstrucción tridimensional del

volumen celular a partir de los planos confocales muestra la presencia en la parte inferior de las vesículas de una acumulación preferencial de la señal correspondiente a extremo C-terminal (epítipo Flag) lo que sugiere una localización preferencial de este extremo hacia el exterior de estas estructuras (Figura 34 B). Por otra parte, es importante destacar que la presencia del epítipo de 6xHis en el extremo amino terminal de la proteína no afecta a la formación de las vesículas esféricas observadas con la construcción ORF1-Flag.

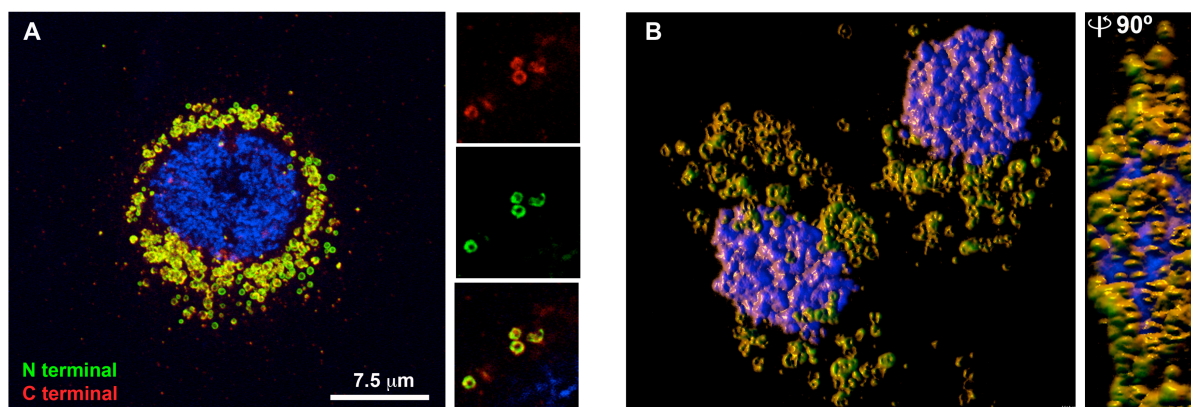


Figura 34. Marcaje diferencial de los extremos amino y carboxilo terminales vistos por microscopía confocal de fluorescencia. A) El patrón de expresión del ORF1 de TaV en donde se detectó la repetición 6xHis con un anticuerpo conjugado con Alexa 488 (verde) y el epítipo Flag con un anticuerpo conjugado a Alexa 594 (rojo). En los recuadros se destacan algunas de las estructuras en forma de anillo. B) Reconstrucción tridimensional del marcaje doble para los extremos del ORF1 de TaV.

Estos resultados sugieren que la proteína podría estar asociada a algún compartimento membranoso sobre el cual podría ejercer modificaciones a lo largo del tiempo que dura su expresión.

4.3. Localización subcelular del ORF1 de TaV

En base a lo observado anteriormente, se realizó una búsqueda en base de datos y programas de predicción de localización subcelular para intentar localizar secuencias potencialmente responsables de la interacción de la proteína con compartimentos membranosos. Este análisis resultó infructuoso por lo que decidimos abordar un estudio sistemático empleando la proteína. Pero al no haber encontrado un resultado, se empleó la construcción del ORF1 de TaV conteniendo el epítipo Flag en su extremo carboxilo terminal y diferentes marcadores subcelulares para establecer la ubicación de la proteína recombinante.

La visualización de la polimerasa se realizó a la 24 h p.t. en donde se observaba una acumulación moderada de proteína. De esta manera se intentó conservar la integridad de las membranas intracelulares para facilitar su identificación.

En todos los casos, se halló a la proteína ORF1 formando un patrón de puntos dispersos en el citoplasma al igual que en resultados previos obtenidos a 96 h p.t.

La identificación de las gotas de lípidos (del inglés, *lipid droplets*, LD) con la sonda fluorescente BODIPY 493/503, cuya morfología es similar a las vesículas que forma el ORF1 de TaV, no coincidió con la ubicación de la polimerasa (Figura 35 A). Tampoco se halló la proteína asociada o en el interior de las mitocondrias, identificadas con la sonda *Mitotracker Deep Red FM* (Figura 35 B).

En base a los ensayos bioquímicos *in vitro*, en donde se determinó que la polimerasa es funcional a pH ácido, se decidió analizar posible presencia de la proteína en compartimientos ácidos de la célula como los lisosomas. Para ello se empleó la sonda fluorescente Lysotracker Red DND-99, cuya señal no presentó niveles significativos de colocalización con la ORF1 de TaV (Figura 35 C).

Otra organela membranosa analizada fue el retículo endoplasmático (RE). Para ello, se empleó un anticuerpo monoclonal contra la proteína disulfuro isomerasa (PDI) relacionada con la síntesis de proteínas, el metabolismo de lípidos y el transporte intracelular residente en esta organela. En algunas células se observó una colocalización parcial del ORF1 y el RE (Figura 35 D) puesta en evidencia como la formación de color amarillo. Sin embargo, un análisis cuantitativo de las imágenes reveló que la presencia colocalización no es suficientemente significativa (<20%) para establecer de forma taxativa la localización de la ORF1 en RE.

Por último, se analizó el aparato de Golgi (AG) empleando la aglutinina de germen de trigo conjugada con el fluoróforo Alexa 594. Esta organela membranosa vinculada al RE, cumple un papel importante en la distribución de lisosomas, modificación de lípidos y glicosilación de proteínas. La localización del ORF1 con el epítipo Flag no coincidió con el marcador de AG (Figura 35 E).

Como se mencionó anteriormente, teniendo en cuenta los efectos de la acumulación del ORF1 el estudio de la distribución subcelular de ORF1 fue realizado a 24 h p.t.. No obstante, a la vista de los resultados obtenidos, se abordó el mismo estudio de empleando muestras recogidas a un tiempo tardío (96 h p.t.). Estos experimentos confirmaron los resultados anteriores (imágenes no mostradas) no observándose colocalización significativa del ORF1 de TaV con ninguno de los marcadores de organelas empleados. Por lo tanto no se pudo identificar la procedencia de una estructura posible estructura membranosa que la que podría interaccionar ORF1 de TaV.

Otra posibilidad es que las estructuras observadas se deban a agregados proteicos a cuyo núcleo no puedan acceder los anticuerpos.

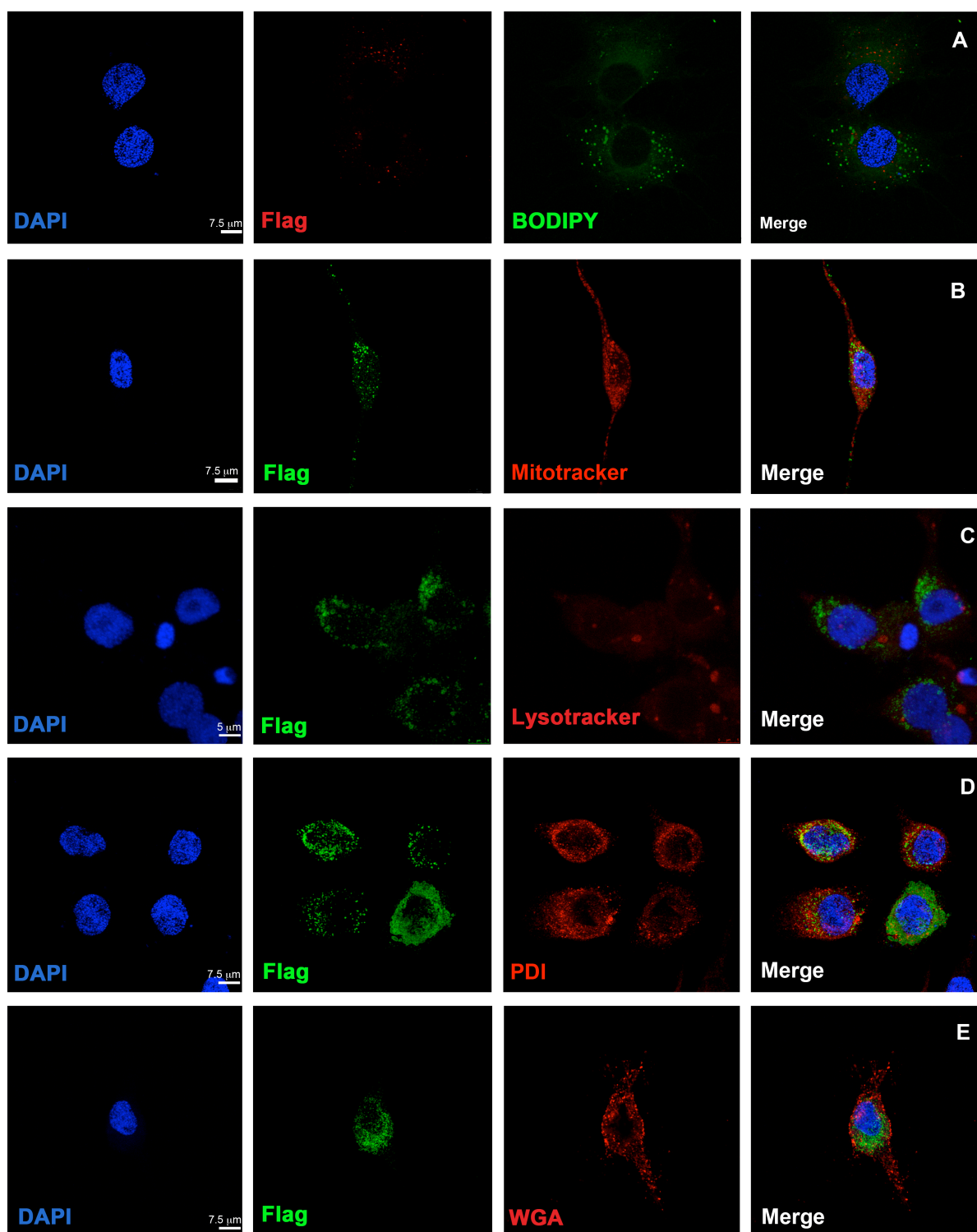


Figura 35. Inmunofluorescencia indirecta del ORF1-Flag de TaV y marcadores de organelas. La proteína recombinante se observó con un anticuerpo α -Flag (color indicado en cada panel), epítipo presente en el extremo carboxilo terminal de la proteína recombinante. Las organelas fueron marcadas con sondas y anticuerpos específicos en células fijadas con p-formaldehído (3%) 24 hs después de ser transfectadas con el vector pLEX-2.1-ORF1-Flag. Los marcadores empleados fueron: BODIPY, para identificar las gotas lipídicas (A); Mito y LysoTracker para visualizar mitocondria (B) y lisosoma (C) respectivamente; el anticuerpo α -PDI, para observar el retículo endoplasmático (D) y WGA para marcar Golgi (E).

4.4.4. Distribución de los dominios independientes del ORF1 de TaV

Para comprender el papel de los dominios N- (D1) y C-terminal del ORF1 en la distribución subcelular de la proteína, se llevo a cabo la expresión de ambas regiones de forma independiente. Ambos dominios se comportan de forma diferente a la proteína completa. El del extremo amino terminal, presenta una distribución citoplasmática (Figura 36) y provoca una notoria alteración de la morfología celular. La forma ahusada de una célula normal es reemplazada por una morfología estrellada en células que expresan este dominio, lo que sugiere que su expresión provoca estrés celular.

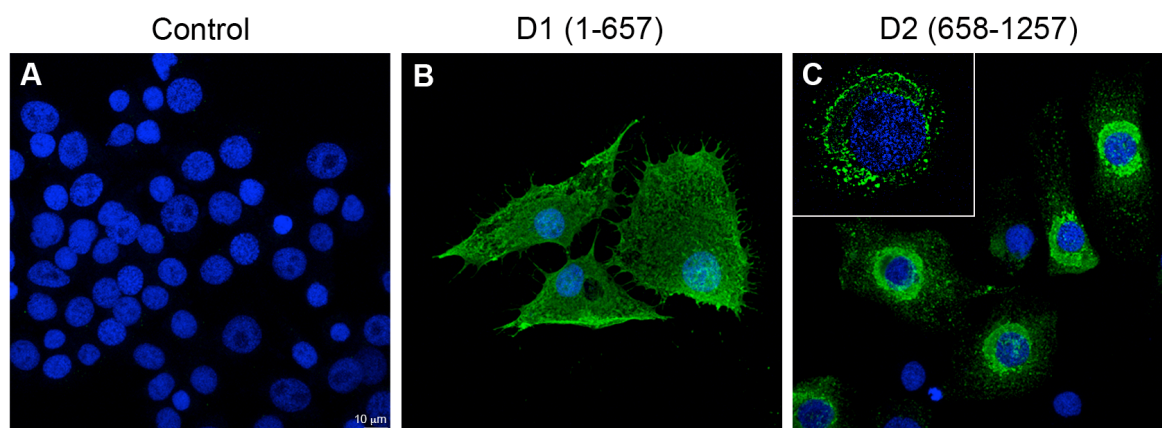


Figura 36. Inmunofluorescencia indirecta de los dominios amino (D1) y carboxilo (D2) del ORF1 de TaV. Control de transfección en donde no se aprecia señal inespecífica de los anticuerpos empleados. B) El D1 comprendido entre los aminoácidos 1-657 del ORF1 precedido por un epítipo 6xHis, se detectó con un anticuerpo monoclonal específico contra ese epítipo 96 hpt. C) El D2 comprendido entre los aminoácidos 658-1257, también precedido por un epítipo de 6xHis se detectó con el mismo anticuerpo que el D1 96 hpt. En el margen superior izquierdo se muestra un corte confocal magnificado de la célula señalada con una flecha blanca en el panel de la imagen.

Contrariamente a lo observado con el dominio N-terminal la el dominio carboxilo terminal aislado (Figura 36) presenta una distribución perinuclear dispersa con una gran acumulación de proteína. Esta acumulación no parece alterar significativamente la morfología. Aunque el patrón de expresión es claramente diferente al observado con la proteína completa, en algunas imágenes se observó una ubicación significativa del D2 sobre contornos definidos. Estos resultados, además del patrón disperso obtenido para el D1, sugieren que en el extremo carboxilo terminal del ORF1 podría ser responsable de la hipotética unión a membranas.

4.4.5. Estudio por mutagénesis del dominio carboxilo terminal del ORF1 de TaV

Con el objetivo de identificar la región del D2 responsable de la localización de la proteína se realizó un estudio de la carga e hidrofobicidad de esta secuencia. Para ello, se sometió la secuencia del ORF1 a un análisis bioinformático para clasificar sus aminoácidos según la escala de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle 1982). En la secuencia que comprende el D2 existen tres regiones con una hidrofobicidad destacable y, por tanto, de potencial interés para la identificación de regiones afines a membranas (Figura 37). Además, los últimos 12 residuos de la proteína, contienen tres residuos de triptófano con marcado carácter hidrofóbico. Atendiendo a esta información, se diseñaron diferentes mutantes de delección sobre el ORF1 de TaV para ser empleados en ensayos de inmunofluorescencia indirecta (Figura 32).

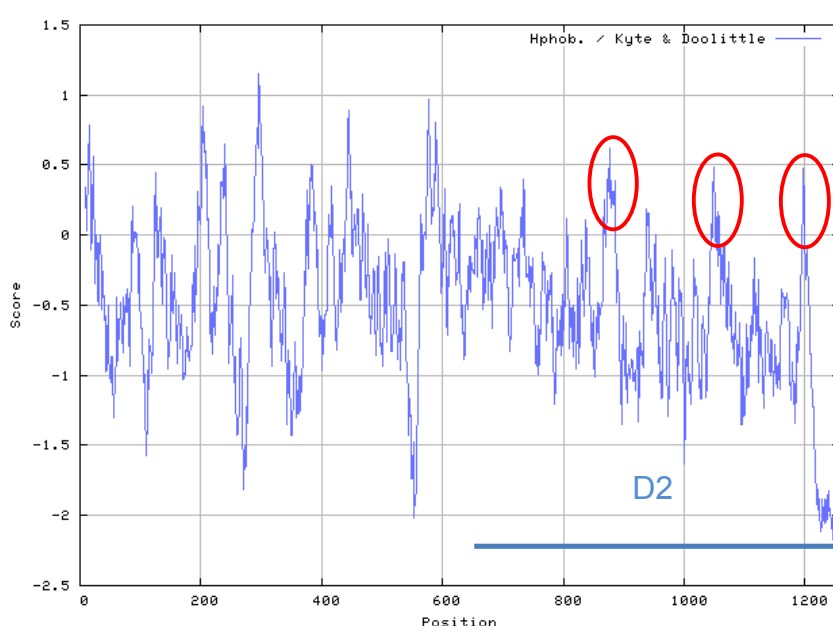


Figura 37. Perfil de hidrofobicidad del ORF1 de TaV. Mediante la herramienta ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/pscale>) para una ventana de 21 aminoácidos se calculó el valor promedio de la escala de aminoácidos según Kyte y Doolittle, y se graficó en función de su posición. Los valores positivos corresponden a la mayor hidrofobicidad. Con las elipses rojas se destacan las regiones del D2 con más carácter hidrofóbico. El eje de las abscisas corresponde a la posición del aminoácido y el eje de las ordenadas representa la escala de aminoácidos.

La detección del epítipo de 6xHis en el extremo amino terminal permitió visualizar las diferentes proteínas de delección a 96 h p.t. Como se puede observar en la figura 38, la eliminación de los 278 aa del extremo C-terminal en la proteína mutante $\Delta 979$, afecta la distribución del ORF1 de TaV (Figura 38 D). Esta proteína presenta una más dispersa en el citoplasma celular. La siguiente delección, que corresponde a los últimos 363 aa en la proteína mutante $\Delta 894$, resulta en un aumento de la distribución citoplasmática pero aun se encuentra parte de la proteína asociada a estructuras globulares (Figura 38 E). Esto sugiere que la capacidad potencial de unión a membranas se habría visto fuertemente perturbada con esta eliminación de aminoácidos pero aun se conservaría parte de la capacidad de

unión. Finalmente la eliminación de todo el dominio carboxilo terminal produce la dispersión total de la proteína en el citoplasma, conforme a lo que se había observado anteriormente.

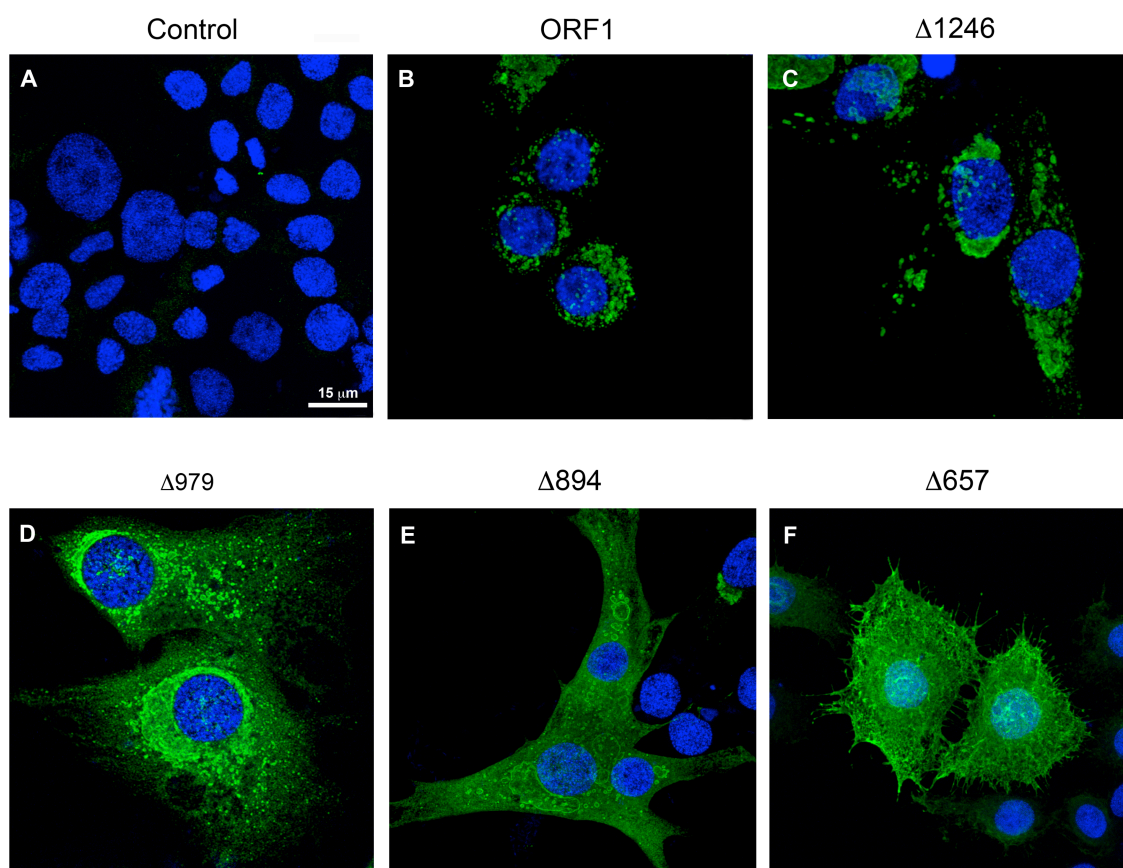


Figura 38. Inmunofluorescencia indirecta del ORF1 de TaV y las diferentes mutantes del extremo carboxilo terminal. El epítopo 6xHis precediendo a la secuencia de cada construcción fue detectado con un anticuerpo monoclonal específico (Alexa488, verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul).

Estos resultados indican que existe una región de la proteína comprendida entre los aminoácidos 658 y 894 que es potencialmente esencial para la interacción del ORF1 de TaV con membranas intracelulares. No obstante no es posible descartar la presencia de una segunda región comprendida entre los aminoácidos 895 y 979 que coopere en dicha interacción y posterior modificación.

4.4.6 La RpRd de TaV es activa en células de insecto

La disponibilidad de ARN de simple cadena que puede ser utilizado como molde por la RpRd de TaV es ilimitada en el interior celular. Como resultado de esta actividad y no existiendo una región con actividad helicasa detectable en la secuencia de ORF1, sugiere que durante el proceso de polimerización se debe producir dsARN. La vida media de estas moléculas dependerá en gran medida de su ubicación con respecto a la maquinaria celular

procesadora de dsARN así como de la capacidad de la ORF1 para protegerlo frente a una posible degradación. Tienes que explicar como se realizaron los experimentos.

En células Hi5 que expresan la proteína ORF1-Flag se detectó la presencia de dsARN, producto de la polimerización de ARN sobre una hebra inespecífica de molde (Figura 39, A y B). Sorpresivamente, no en todas las células en donde se identificó la proteína recombinante se pudo detectar la presencia de dsARN.

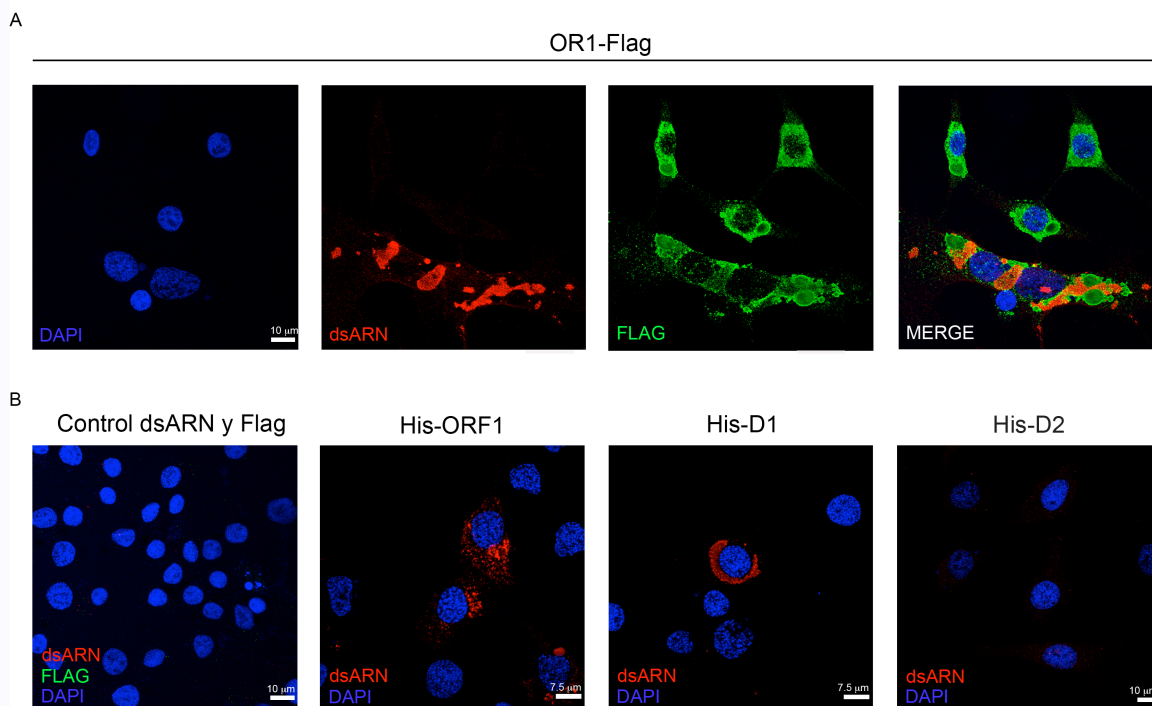


Figura 39. Detección de dsARN por inmunofluorescencia indirecta. La RpRd de TaV expresada con el epítipo Flag en el extremo carboxilo terminal se identificó con el fluoróforo Alexa 488 (verde) y el dsARN con Alexa 568 (rojo) en células Hi5 (A). Con el mismo anticuerpo se identificó el dsARN en células transfectadas para expresar la His-RpRd y los dominios amino y carboxilo terminales (B).

Por otra parte, debido a que los anticuerpos α -histidinas y α -dsARN disponibles tienen el mismo origen (ratón), no se pudieron marcar ambos elementos en la misma muestra. Por esa razón, en células transfectadas con los dominios aislados y el ORF1, portadores de la repetición de 6 histidinas en sus extremos N-terminales, solo se identificó el dsARN (Figura 39 B).

En células transfectadas con el His-ORF1 se detectó dsARN, lo que confirma que la presencia de una región heteróloga en el extremo amino terminal de la proteína no inhibe la actividad polimerasa de la proteína (Figura 39 B). Igualmente, se detectó la presencia de dsARN en células que expresaban dominio N-terminal de forma independiente, lo que confirma que esa porción de la proteína es suficiente para la actividad polimerasa e

independiente del dominio carboxilo terminal (Figura 39 B). Llamativamente, la distribución del dominio N-terminal es citoplasmático (Figura 36) pero la presencia de dsARN solo fue detectada en una región definida alrededor del núcleo (Figura 39 B). Esto sugiere que algunas moléculas de la polimerasa son activas en regiones o compartimientos subcelular específicos que le proveen al dominio N-terminal de los elementos necesarios para su actividad. O por el contrario, que en el citoplasma celular exista algún elemento que inhiba la actividad de la RpRd de TaV o impida la detección del dsARN.

En células transfectadas con extremo C-terminal aislado, no se detectó la acumulación de dsARN lo que indica que esta región de la proteína no está implicada en la actividad polimerasa y confirma que la presencia de esa molécula en el interior celular de células que expresan la ORF1 completa o su extremo N-terminal es debida de forma específica a la actividad RpRd de estas proteínas (Figura 39 B).

En conjunto, estos resultados indican que la RpRd de TaV es funcional en células de insecto y que su actividad radica exclusivamente en el dominio amino terminal.

"Quien se dedica a investigar está obligado a que sus principios copien fielmente a la Naturaleza; tiene que apresar determinados aspectos complejos de lo experimental para poder expresarlos rigurosamente"

Albert Einstein

Discusión

5.1. La permutación del dominio de la palma en la RpRd de TaV no afecta a la arquitectura del centro activo ni tampoco a su función

Las RpRds han sido ampliamente estudiadas por ser enzimas exclusivas de los virus y por ende una diana efectiva en tratamientos antivirales.

En el año 2002 emergió particular interés cuando se describió un grupo atípico de polimerasas que presentaban una permutación secuencial de los dominios conservados del centro activo, donde la forma canónica A-B-C pasaba a una organización C-A-B (Gorbalenya y col. 2002). Ese grupo estaba formado por virus con genoma de dsARN, pertenecientes a la familia *Birnaviridae* (IBDV e IPNV), y por los virus TaV y EaV, con genoma +ssARN, recientemente clasificados dentro de la familia *Permutotetraviridae*.

En un trabajo previo del laboratorio (Garriga y col. 2007) se resolvió la estructura cristalográfica de la RpRd de IBDV, y se demostró que la reorganización de motivos era compatible con la arquitectura de un sitio activo funcional de una RpRd. Por otro lado, en publicaciones anteriores se había demostrado la funcionalidad de la enzima (von Einem y col. 2004).

La particular organización de secuencia en dos linajes distintos de virus, hacía suponer un vínculo evolutivo entre ambos, y por ello era necesaria información estructural de ambos linajes para comprender su relación y función. En el presente estudio se ha logrado expresar, purificar, cristalizar y resolver la estructura cristalográfica del dominio RpRd de TaV. Para la expresión y purificación se debieron usar distintos recursos, ya que la proteína recombinante codificada por la ORF1 es susceptible a degradación, especialmente cuando era expresada con BV en células de insecto (Hi5). Por otra parte, el cambio de sistema viral de expresión (VV) y también la expresión transitoria con el vector pLEX-2.1 en las mismas células de insecto, ha permitido obtener la proteína íntegra. Este hecho sugiere que la degradación se produce por una proteasa del BV y no por un mecanismo de autoproteólisis, como en otras proteínas virales. Si bien no se conoce la identidad de esta proteasa, el hecho de que pueda inhibirse añadiendo leupeptina en el medio de cultivo celular, indica que pertenece a la familia de las cisteín-proteasas.

La estructura cristalográfica del dominio RpRd ha revelado la conservación de la arquitectura del sitio activo, acorde con lo propuesto a partir de estudios *in silico* (Gorbalenya y col. 2002) (Figuras 17 y 19). Por otro lado, la caracterización bioquímica de la actividad RpRd en TaV realizada también en este trabajo muestra que la relocalización del motivo catalítico C, no compromete la actividad de esta enzima, constituyendo la primera muestra de la actividad de una RpRd no canónica de un virus ssARN (Figura 11). La

reorganización de dominios o secuencias cortas sin cambios drásticos en la arquitectura 3D, ha sido posible en la evolución gracias a la presencia de lazos sobre los cuales se establecen las nuevas conexiones (Lo y col. 2012; Bliven y Prlic 2012) entre los elementos de estructura secundaria que se mantienen estrictamente conservados.

5.2. La RpRd de TaV es capaz de sintetizar ssARN *de novo*

Los ensayos de polimerización *in vitro*, han demostrado que el dominio cristalizado es capaz de incorporar nucleótidos sobre moldes de ssARN, de distintos tamaños y secuencias, en ausencia de cebador (Figuras 11 y 12). Estos análisis también muestran que el dominio RpRd aislado posee la misma actividad que la proteína entera (Figura 24 resultados), como cabría esperar puesto que la estructura cristalográfica muestra la presencia de todos los motivos necesarios para llevar a cabo la polimerización. Actividades similares a TaV se han descrito en otras polimerasas del género Flavivirus (Selisko y col. 2006).

El perfil cinético de la polimerización se aproxima a una curva sigmoidea, con un período de ~20 min en donde la actividad es escasa, seguida de otra etapa en donde sucede lo contrario (Figura 15). Aquel período de pausa, se ha observado en otras RpRd (Lohmann y col. 1997; Jin y col. 2013; Selisko y col. 2012), en especial del género Flavivirus (DV o HCV), en donde el producto de elongación es visible a partir de ~30 min. Se ha descrito que el tiempo previo, es empleado por estas enzimas para formar los complejos de iniciación *de novo*. Estas coincidencias en el perfil cinético de la polimerización, indican que la RpRd de TaV se comporta de forma parecida a los Flavivirus (Lohmann y col. 1997; Jin y col. 2013; Selisko y col. 2012).

5.3. Regulación del lazo $\lambda 6$ sobre la actividad de la enzima y mecanismo de iniciación

El subdominio del pulgar posee un lazo ($\lambda 6$) que cubre la cavidad central de la enzima (Figura 20). Su tamaño y disposición, establece un paralelismo con las estructuras secundarias encargadas de conferir a las RpRds la capacidad de iniciación *de novo* en otros virus (Choi y col. 2004; Malet y col. 2007; Selisko y col. 2012; Mosley y col. 2012), principalmente de la familia *Flaviviridae*. Esas estructuras otorgan una plataforma para que el primer nucleótido interaccione de forma estable con la proteína, permitiendo la iniciación de la polimerización. Para ello, la presencia de residuos aromáticos en la punta del lazo es fundamental. Por ejemplo, los amino ácidos W795 y H798 la RpRd DV, o la Y448 en la

polimerasa de HCV, son los encargados de formar la plataforma de iniciación. En la RpRd de TaV, los residuos de Y611 y F613 del lazo $\lambda 6$ podrían cumplir la misma función (Figura 40).

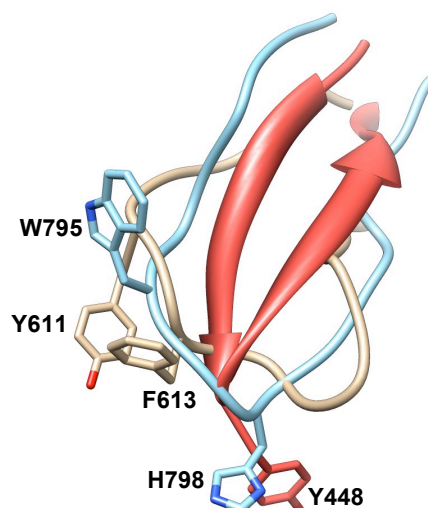


Figura 40. Conservación del lazo cebador. Alineamiento estructural de los lazos empleados como cebador (*Priming loops*) en las RpRd de HCV (rojo), DV (celeste) y TaV (marrón). Solo se muestran los aminoácidos voluminosos implicados en la iniciación de novo de HCV y DV, así como sus posibles homólogos en TaV.

La estructura del complejo TaVRpRd-ssRNA-GTP/CTP obtenido en presencia de Mn^{2+} muestra la presencia del sustrato GTP en el centro activo de la polimerasa con la base reposando sobre el lazo $\lambda 6$ en contacto directo con los residuos Y611 y F613 (Figura 28). Esta evidencia estructural indica que efectivamente el lazo $\lambda 6$ puede actuar como plataforma de iniciación de la replicación en TaV. En este trabajo se ha estudiado también el efecto del lazo $\lambda 6$ en la actividad RpRd de TaV mediante ensayos bioquímicos con mutantes de delección. Los resultados obtenidos han demostrado que la delección del extremo del lazo no elimina la actividad ARN polimerasa de TaV, sino que provoca un aumento en la actividad de la enzima de hasta 30 veces (Figura 20). Resultados similares fueron obtenidos con delecciones en los lazos homólogos en las polimerasas de DV y HCV (Selisko y col. 2012; Mosley y col. 2012). La razón de este aumento de actividad, se atribuyó a que el lazo es una estructura autoinhibitoria que bloquea la salida del dsARN recién sintetizado durante el proceso de elongación. Por lo tanto su delección favorece la apertura de la cavidad central de la enzima, permitiendo la entrada de un dsARN, sobre el cual la polimerasa elonga el cebador. La estructura cristalográfica de un complejo de la RpRd de HCV con un fragmento dsARN mostró además que la ausencia del lazo autoinhibitorio facilitaba una reorganización global de los dominios de los dedos y el pulgar formando una cavidad central más ancha capaz de acomodar el dsARN (Mosley y col. 2012). En los experimentos presentados en este

trabajo, al igual que en las publicaciones sobre DV, HCV y $\phi 6$ (Selisko y col. 2012; Mosley y col. 2012; Laurila y col. 2002), el ARN usado como molde (311 nts) es capaz de formar una horquilla sobre su extremo 3' debido a la complementariedad de bases. Esta es la porción de dsARN de la horquilla que puede situarse en la cavidad de la RpRd con la delección en el $\lambda 6$, y aprovechar el extremo 3' libre como cebador para extenderlo por el proceso denominado "*back priming*" (Figura 5).

En su conjunto, los resultados de los distintos ensayos de polimerización obtenidos en este trabajo indican que la RpRd de TaV comparte el mismo mecanismo de iniciación *de novo* que la familia de los Flavivirus (Selisko y col. 2006), donde el lazo $\lambda 6$ actúa como plataforma iniciadora de la replicación de forma análoga a los lazos de DV o HCV.

Por otro lado, los resultados de los ensayos de polimerización utilizando como molde oligonucleótidos cortos de distinta longitud y secuencias, indican que si bien no existe una especificidad de secuencia, la presencia de una G en el extremo 3' del molde puede ser un factor determinante para la iniciación (Figura 12). Esta selectividad de nucleótido inicial también ha sido hallada en otras RpRds.

Uno de los ejemplos de iniciación de la replicación *de novo* mejor descrito desde el punto de vista estructural proviene de la estructura del complejo de iniciación del bacteriófago $\phi 6$ (Butcher y col. 2001; Laurila y col. 2002). Este modelo estructural puede extenderse para explicar como tendría lugar la iniciación de la replicación en Flavivirus y también en TaV.

En el modelo estructural de $\phi 6$ (Figura 41), la hebra de ácido nucleico molde entra por el túnel del RNA molde, donde la base del nucleótido 3' (T1) se introduce en una cavidad frente al sitio activo denominada sitio S. De esta manera el molde queda bloqueado. Rápidamente un nucleótido se sitúa sobre el sitio activo cuya base es estabilizada en el sitio P. En particular, un aminoácido aromático (Y630) de un lazo de la proteína sirve como plataforma para estabilizar la posición del primer nucleótido que será agregado sobre la hebra del molde (T2). A su vez este lazo, interfiere con la formación de un cebador por auto complementariedad de secuencia en el molde (Laurila y col. 2002). Después el molde se retira hacia atrás ayudado por interacciones electrostáticas, liberando el nucleótido T1 del sitio S. Al momento, un segundo NTP se posa sobre el sitio P para dar por formado el complejo de iniciación de dos nucleótidos liberando pirofosfato.

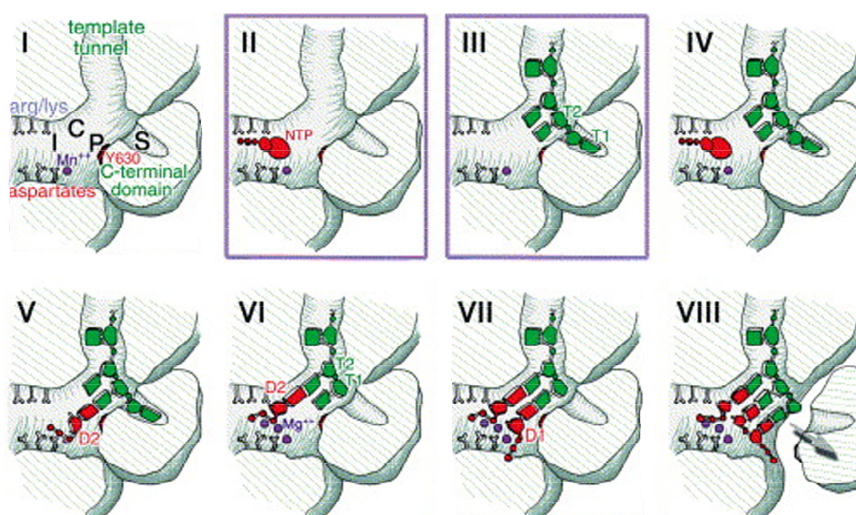


Figura 41. Mecanismo de iniciación de novo. En este esquema se muestran las distintas etapas en el mecanismo de iniciación de la polimerización para la RpRd del bacteriófago $\phi 6$ propuesto por Butcher y colaboradores. Los recuadros en violeta muestra las etapas equivalentes en el mecanismo de polimerización de TaV que se han podido ver en las estructuras presentadas en esta memoria. Figura tomada de Butcher y col. 2001.

En la estructura de TaV, el ARN molde es dirigido hacia el sitio activo por la interacción con un canal con carga positiva en su superficie. En una de las cadenas protéicas (B) del dímero, la base del nucleótido 3' del molde se encuentra inmersa en una pequeña cavidad cuya base está formada por el inicio de la α -hélice del motivo B. En particular por los residuos de T443 y T444 (Figura 27). En otra de las estructuras, una molécula de GTP se encuentra posando su base sobre el extremo de residuos aromáticos del $\lambda 6$, equivalente a lo que sucede en el sitio P de la RpRd de $\phi 6$ (Figura 27). En la otra cadena de la misma estructura se observa un GTP sobre el sitio activo, explicando cómo se pondría el nucleótido al incorporarse a la cadena de ARN sintetizada (Figura 28). Si bien todos estos elementos no se encuentran en la misma estructura a la vez, es de suponer que la disposición de estas moléculas sea similar en la formación de un complejo de iniciación. En base a esto, es posible extrapolar el mecanismo de iniciación de la polimerización al del bacteriófago $\phi 6$ y por ende, al mecanismo empleado para la iniciación de novo en los Flavivirus.

5.4. Modificación covalente y papel del motivo B de la RpRd de TaV

La modificación covalente de las RpRd ha sido descrita como un mecanismo para regular su actividad. En algunos casos las RpRds o proteínas accesorias como las VPgs, presentan la unión covalente con un nucleótido que actuará como cebador para la iniciación de la polimerización (citas de picorna, calici y Birna).

En trabajos previos se hipotetizó que la iniciación de la replicación en TaV sería dependiente de cebador. Se sugirió también que el mecanismo de iniciación sería similar al descrito para los birnavirus IBDV e IPNV (Citas), donde la propia polimerasa es capaz de funcionar como VPg y RdRp. Incluso se describió que la RpRd de TaV contenía una secuencia VPg (Zeddam y col. 2010), comprendida entre los residuos 153-165, en donde la T157 sería potencialmente modificada, pero nunca se ha demostrado esta actividad “in vitro” de esta polimerasa.

Los ensayos de polimerización *in vitro* realizados en el laboratorio con la RpRd mutante T157A muestran que este residuo no afectan a la polimerización (no mostrados).

Por otro lado, las mutaciones sobre dos residuos del motivo B: T443A y T444A han resultado en una polimerasa totalmente inactiva (Figura 27). El papel esencial de varios residuos conservados del motivo B en otras polimerasas se ha descrito en numerosos trabajos, incluyendo HCV y el picornavirus EMC donde la sustitución de la Thr equivalente a T443 por S, C, K eliminaba totalmente la actividad enzimática (Lohmann y col. 1997; Sankar y col. 1992). Las estructuras cristalográficas de varios complejos de elongación en picornavirus han mostrado también que el motivo B juega un papel esencial en la unión del ARN molde y también en la translocación del dsARN recién sintetizado (Ferrer-Orta, y col. 2007; Gong y Peersen 2010; Garriga y col. 2013; Peersen y col. 2013; Gong y col. 2013).

Dos de las estructuras cristalográficas presentadas en esta memoria ilustran el papel clave de estos residuos del motivo B en la actividad RpRd de TaV. La estructura del complejo ssARN-RpRd, muestra que estos dos residuos están situados en la base del canal donde se acomoda el nucleótido 3' del ssARN molde (Figura 27).

En otra de las estructuras cristalográficas se halló una llamativa modificación covalente que involucra al motivo B. En ella se observó una voluminosa densidad electrónica conectada con la perteneciente a la del residuo T444. Esta densidad fue interpretada por la presencia de un GMP unido covalentemente con la T444 a través del OH de la cadena lateral (Figura 28). Esta modificación covalente se encuentra en la base del canal de entrada del ARN molde por lo que no parece estar relacionada con la nucleotidilación de las RpRds de Birnavirus y su supuesto papel como iniciador de la replicación en estos virus. En lo que se refiere a TaV, por el momento desconocemos el papel que puede tener esta modificación de en la regulación de la actividad de la enzima. Será necesario un profundo análisis bioquímico para desentrañar el mecanismo de nucleotidilación y su papel en la polimerización.

5.5. El N-terminal de la ORF1 regula la actividad y el estado de oligomerización

El homodímero de la RdRp de TaV en el cristal y en solución, es compatible con lo observado en otras polimerasas. La oligomerización de RpRds ha sido descrita para norovirus (Högbom y col. 2009), el virus de la Polio (Hobson y col. 2001; Wang y col. 2013), FMDV (Bentham y col. 2011), rinovirus humano y HCV (Chinnaswamy y col. 2010; Clemente Casares y col. 2011). Lo que sugiere una característica común entre las RpRd que incide directamente sobre la actividad de la enzima, aunque su base estructural no está demasiado clara.

En el caso de la RpRd de TaV, la polimerasa forma un dímero por la interacción recíproca del extremo N-terminal de una molécula y la cavidad central de una vecina. Además, ambas interaccionan con sus extremos C-terminales (Figura 22). No obstante, hemos comprobado a partir de un mutante de delección del extremo amino terminal (mutante $\Delta 27$) que la primera de las interacciones es indispensable para mantener el dímero de la proteína. Curiosamente, se ha observado que la proteína mutante $\Delta 27$ no sufre el procesamiento proteolítico de la región C-terminal que se detecta en la proteína nativa expresada a partir de rBV, lo que podría indicar que la formación de un dímero de la proteína entera facilitaría la exposición de una secuencia susceptible a degradación por proteasa(s) de BV, produciendo un dímero estable que no se observaría de otra forma, porque el extremo C-terminal, por impedimentos estéricos, podría impedirlo (Figura 42) .

Como se observó en el caso de la polimerasa de norovirus (Lee y col. 2011), la formación de un dímero de la proteína del ORF1 (140 kDa) puede coexistir dinámicamente en presencia de un monómero de la proteína. En el caso de la ORF1 de TaV no se pudo detectar la presencia de un dímero estable por cromatografía de exclusión molecular o en imágenes de microscopía electrónica. No obstante, ha sido descrito para otra polimerasa que pueden hallarse discrepancias entre lo que sucede en solución y las determinaciones bioquímicas utilizadas para estudiar la oligomerización de la enzima (Högbom y col. 2008; Lee y col. 2011). Estas discrepancias reflejan diferencias en las características de las diferentes técnicas empleadas (efecto de dilución, flujo de elución, etc.).

La ubicación del extremo N-terminal en las inmediaciones del sitio activo ha sido descrita también en la RpRd de IPNV (Graham y col. 2011). En esta polimerasa se ha hipotetizado que el emplazamiento del extremo N-terminal serviría para la unión covalente al ácido nucleico sintetizado. Contrariamente a lo observado para IPNV, nuestros ensayos bioquímicos demuestran que la eliminación de los primeros 27 aminoácidos ($\Delta 27$) del ORF1 de TaV resulta en un incremento drástico de la actividad polimerasa. Resultados similares a

los observados en TaV se han descrito para la RpRd BVDV (Lai y col. 1999). Estos datos sugieren que el extremo N-terminal es un modulador negativo de la actividad y que el dímero del fragmento RpRd, observado en la estructura cristallográfica, representa la estructura de la polimerasa en su estado reprimido. Los ensayos *in vitro* eliminando el *tag* de histidinas y comparando la actividad de esta proteína con su contraparte WT completa, permitieron establecer que la modulación negativa del extremo N-terminal es intrínseca de la RpRd, ya que no depende de la presencia/ausencia de *tag*, ni del extremo C-terminal del ORF1. Estos resultados sugieren un mecanismo de regulación que implicaría el bloqueo del acceso de los sustratos, en particular del RNA molde a la cavidad central de la polimerasa por acción del extremo N-terminal, que compite con el correcto posicionamiento de este ARN y por tanto con el funcionamiento de la enzima. De hecho, en las estructuras de la RpRd de TaV en complejo con un ARN molde, el extremo N-terminal de la enzima ha sufrido un cambio conformacional y se encuentra desplazado hacia el exterior de la proteína.

No podemos descartar que aún existiendo un cambio conformacional del extremo N-terminal, éste no sea suficiente para activar la enzima, porque en ese caso sería esperable que la ORF1 entera o el fragmento RpRd mostraran una actividad similar a la de la proteína mutante $\Delta 27$. Quizás el extremo flexible N-terminal de la proteína, deba ser procesado por una proteasa del huésped u otro componente viral, como sucede con la autoproteólisis de la proteína de la cápside de TaV (Pringle y col. 1999; Pringle y col. 2001), para dar lugar a una forma desreprimida de la polimerasa en el momento y sitio adecuado durante el ciclo de replicación viral.

Independientemente de los requerimientos del ciclo viral, desconocidos hasta el momento por la imposibilidad de crecer el virus en cultivos celulares, podemos concluir que el extremo N-terminal de la RpRd de TaV es un modulador negativo de su actividad.

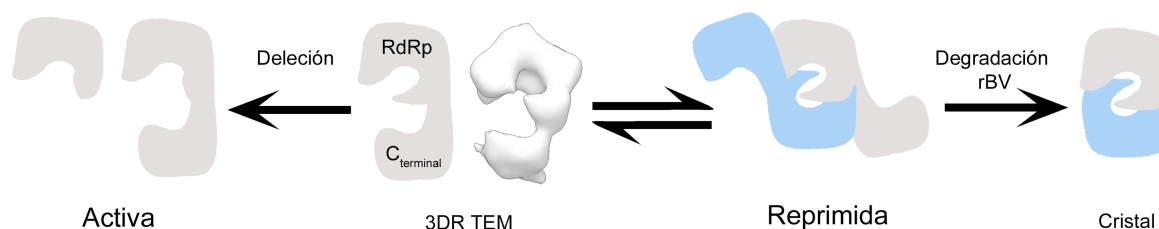


Figura 42. Esquema de los estados de oligomerización del ORF1 de TaV. En cada uno de los estados estudiados por las diferentes técnicas estructurales se pudo comprobar su actividad.

Otra de las características estructurales del dominio N-terminal de TaV, cuya secuencia no comparte con otros ex-miembros de la familia *Tetraviridae* (Zeddami y col. 2010), es la formación de un andamiaje que ayuda a cerrar la estructura de mano derecha de la polimerasa. A diferencia de otros virus en donde alojan en esa porción de la proteína actividad metil-transferasa o helicasa, la estrecha interacción de este dominio, que sirve como conexión entre el subdominio de los dedos y el pulgar, descarta la posibilidad de que esta porción de la enzima asuma otra actividad que no sea la de andamiaje.

5.6. Localización del ORF1 de TaV *in vivo*

Los estudios de localización *in vivo* de la polimerasa se han llevado a cabo en un contexto aislado de la infección viral de TaV ya que, como se ha citado anteriormente, este virus no puede crecer en cultivos celulares. No obstante, la expresión transitoria de la proteína con los vectores pLEX-2 ha permitido producir la proteína, en el interior de células de insecto.

Las imágenes de microscopía confocal mostraron un patrón cinético de expresión de la proteína que puede dividirse en dos etapas. En la primera, a 24 hpt, la proteína forma un patrón de puntos dispersos en el citoplasma, especialmente alrededor del núcleo. En la segunda etapa, desde las 48 hpt a las 96 hpt, la proteína comienza a ubicarse en el contorno de estructuras globulares cuyo tamaño disminuye hacia las 96 hpt, acumulándose en estructuras de aspecto vesicular con un diámetro variable entre 0.5-2 μm (Figura 33). El patrón observado, sugiere que la RpRd de TaV, al igual que otros virus con genoma ARN (Restrepo-Hartwig y col. 1996; Miller y col. 2001; Rust y col. 2001; Kaariainen L y col. 2002; Guo y col. 2004; Miyanari y col. 2007), podría asociarse a membranas intracelulares. Recientemente se ha descrito la asociación de los complejos replicativos de Alphatetravirus y Carmotetravirus a membranas intracelulares resistentes a detergentes, como las del aparato de Golgi (Short y Dorrington 2012; Short y col. 2013).

Los experimentos de co-localización de la RpRd de TaV con diferentes marcadores de organelas celulares no han permitido establecer su ubicación precisa (Figura 35). La escasez de marcadores específicos para orgánulos de insectos ha complicado esta tarea, aunque sería interesante probar más sondas disponibles en el mercado para ubicar una potencial organela. En la actualidad se están llevando a cabo experimentos de análisis ultraestructural mediante inmunomicroscopía electrónica de cortes ultrafinos de células de insecto transfectadas con vectores plasmídicos para intentar localizar la ubicación subcelular de la RpRd.

No obstante, por el momento asumimos que el delineado patrón que muestra la RpRd de TaV en células de insecto corresponde a su localización en membrana, de forma parecida a otras polimerasas de virus con genoma de ssARN. Bajo este punto de vista, los resultados obtenidos con mutantes de delección en el extremo C-terminal, sugieren la existencia de una región de localización en membranas entre los aminoácidos 658 y 894 (Figura 38). Esta ubicación, en la región el C-terminal de ORF1, es similar a la observada para HaSV, un Alphetetravirus (Short y Dorrington 2012). En HaSV, se ha descrito la existencia de una secuencia, aún no caracterizada, en el extremo C-terminal del dominio RpRd que dirige esta proteína a membranas intracelulares resistentes a detergentes.

Mediante microscopía confocal de fluorescencia se detectó la presencia de dsARN en células de insecto transfectadas con distintas construcciones que contenían el dominio RdRp (Figura 39). Llamativamente, no en todas las células transfectadas, en donde era evidente la presencia de la proteína de TaV, se detectó dsARN, sugiriendo que no en todas las células se encuentra el ssARN que la polimerasa emplea como molde en la reacción. Este resultado podría deberse a que el ARN(s) celulares utilizados como molde son producidos en una etapa determinada del ciclo celular. La asincronía celular previa a la transfección, podría explicar la ausencia de síntesis de dsARN en algunas células que contienen la RpRd de TaV. No obstante, no se puede explicar así la disparidad entre los patrones de dsARN observados en células transfectadas con el ORF1 de TaV y el dominio RpRd presente en el extremo N-terminal. En este último caso, el dsARN parece encontrarse confinado a una región próxima al núcleo, en oposición a la distribución citoplasmática difusa observada con anticuerpos que reconocen la proteína (Figura 39).

5.7. Caracterización estructural del extremo C-terminal en la ORF1

Los resultados obtenidos por microscopía confocal, han demostrado una función para el extremo C-terminal del ORF1 de TaV C-terminal del ORF1, que carece de homología de secuencia con las proteínas depositadas en bases públicas de datos. Por otra parte, los experimentos de transcripción *in vitro*, sugerían la importancia del extremo C-terminal en la procesividad de la enzima. Estos resultados en su conjunto, derivaron la atención hacia el extremo C-terminal de la proteína, haciendo necesaria su caracterización estructural. Ante la imposibilidad de cristalizar del ORF1 entero y las dificultades encontradas en la expresión y purificación de múltiples construcciones del dominio C-terminal, se optó por abordar la caracterización estructural, a través de microscopía electrónica.

Para llevar a cabo los experimentos de microscopía electrónica, utilizamos dos construcciones que comprendían únicamente el dominio RpRd y el ORF1 $\Delta 27$ (Figura 7). La reconstrucción 3D de imágenes ha permitido obtener un modelo de densidad compatible con

la estructura del dominio RdRp cristalizado (D1) (Figura 30). Por otro lado, el volumen 3D obtenido a partir de la reconstrucción del mutante $\Delta 27$ ORF1 muestra, además de D1, una densidad extra a continuación que correspondería al extremo C-terminal (Figura 31). En ella se observa un estrangulamiento de la densidad seguido de un volumen de menor tamaño que el correspondiente al dominio N-terminal. Esta región de menor densidad es compatible con una estructura de la proteína que funcione como bisagra conectora entre los dominios N-terminal y C-terminal. No obstante, este segundo volumen sobrante no es suficiente para acomodar los ~600 aa ausentes en la estructura cristalográfica. Posiblemente, en las partículas recogidas para la reconstrucción 3D exista una región del extremo C-terminal de la proteína con diferentes conformaciones, lo que supondría su eliminación durante el procesamiento de los datos. Alternativamente, una gran parte de ese extremo C-terminal podría estar compuesto de largos lazos.

Llamativamente, la ubicación de la densidad extra, es idéntica a la usada por una de las moléculas que conforman el dímero del dominio RpRd observado en la estructura cristalográfica.

5.8. Homología estructural de la RpRd de TaV con otras polimerasas y su implicación evolutiva.

Las permutaciones circulares, como las observadas en los motivos del subdominio de la palma en las RpRds, ocurren en una minoría de proteínas con intercambios de posición de dominios (Szilágyi y col. 2011). Con frecuencia, estos cambios suceden en regiones separadas por lazos (Lo y col. 2012; Bliven y Prlic 2012). Las permutaciones circulares en RpRds han sido descritas en un número reducido de polimerasas (Gorbalenya y col. 2002; Zeddan y col. 2010; Sabanadzovic y col. 2009; Ambrose y col. 2009), pero hasta el momento se contaba únicamente con las estructuras atómicas de proteínas correspondientes a dos Birnavirus, IBDV e IPNV.

El alineamiento de la RpRd de TaV, la primera estructura disponible para un ssARN de ese tipo, mostró una mayor similitud estructural con las RpRds de la familia Flaviviridae, en particular con la de los virus WN y DV a pesar de que en ninguno de los miembros de esta familia se ha encontrado una permutación en el sitio activo. Este resultado ha volcado la atención hacia las características estructurales de la RpRd de TaV y la de otros miembros de la familia Flaviviridae, entre los cuales se encuentran algunos patógenos humanos como el virus Dengue y HCV (Figura 43). Las estructuras resueltas pertenecientes a este grupo revelan una similitud estructural, sobre todo en el lazo que protruye desde el subdominio del pulgar hacia la cavidad central de la polimerasa que es empleado como plataforma de iniciación de la replicación *de novo*, tal como se ha descrito en apartados anteriores.

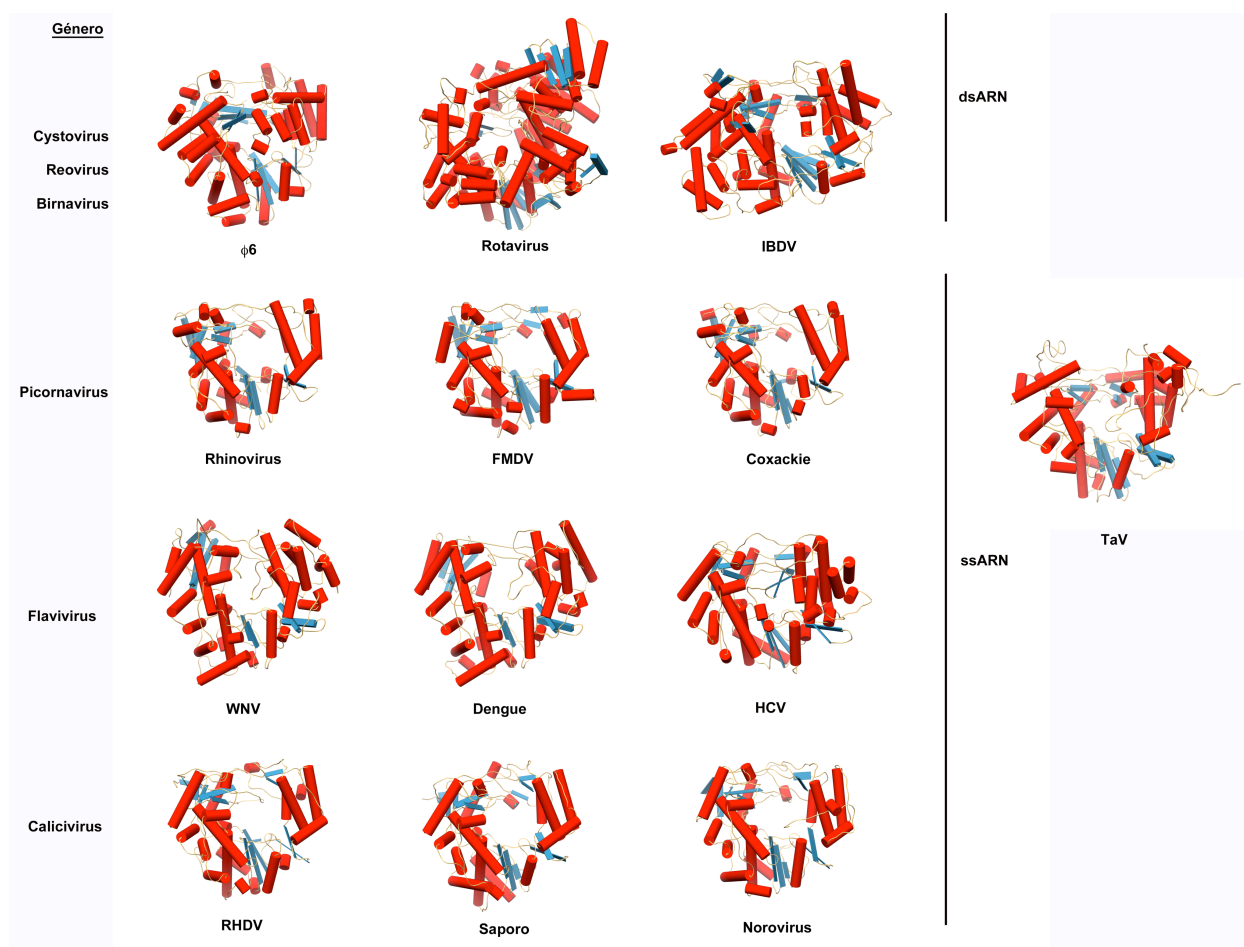


Figura 43. Estructuras de las RpRds resueltas representativas de cada familia viral.

En el año 2002 (Gorbalenya y col., 2002), se sugirió que las polimerasas actuales derivaban de una estructura ancestral con una organización no canónica en el subdominio de la palma. Bajo este modelo, las polimerasas de IBDV e IPNV (miembros de la familia *Birnaviridae*) son descendientes de aquellas polimerasas ancestrales. Por otra parte, la polimerasa no canónica de TaV podría ser un modelo muy próximo a aquel antecesor, y considerando que los virus de ssARN son antecesores, de los de dsARN se establecía una conexión común entre ambos linajes virales.

Los resultados previos del laboratorio, demostraron que la arquitectura del sitio estaba conservada y que globalmente la RpRd de IBDV era similar a la polimerasa de Reovirus $\lambda 3$ (Garriga y col. 2007; Pan y col. 2007).

Teniendo en cuenta las similitudes de la RpRd de TaV y la de los Flavivirus, en especial, la característica obstrucción de la cavidad central por una extensión del subdominio del pulgar, sumado a la similitud del papel funcional de ese lazo, proponemos

dos escenarios evolutivos alternativos al que existe para las polimerasas con palma permutadas:

(i) Sobre una población ancestral con genoma de ssARN (posiblemente del grupo II de ssARN virus o *Flavi-like*) cuyo subdominio de la palma era canónico, sucedió una permutación. Este cambio de secuencia pudo ser reorganizado estructuralmente para dar lugar a una polimerasa con idénticas características funcionales a la polimerasa con palma canónica. Dado que no existió una ganancia o pérdida de actividad, ambos tipos de polimerasa coexistieron, posiblemente confinadas en el mundo de los insectos, llevando caminos paralelos. Bajo este escenario, el linaje de virus con palmas permutadas continuó evolucionando hasta la aparición de los virus de dsARN. Este modelo implica la existencia de un ancestro común entre los Birnavirus y los Permutotetravirus que explicaría la similitud estructural existente entre las RpRds de ambos grupos con las polimerasas de flavivirus.

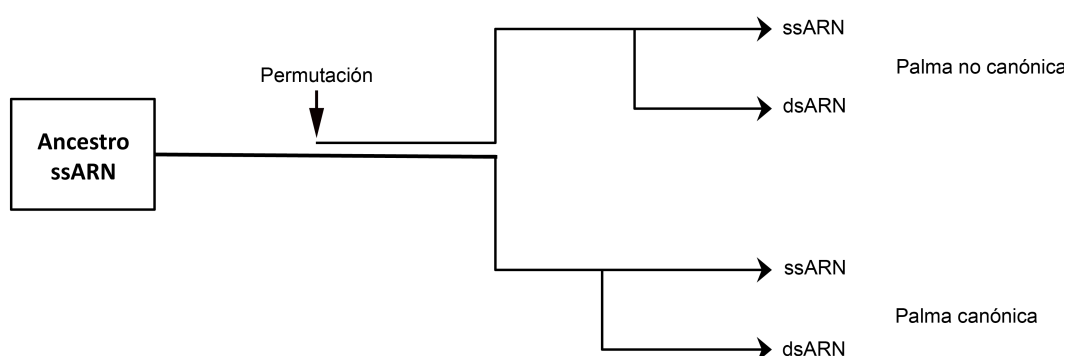


Figura 44. Esquema de la posible relación evolutiva entre los virus con polimerasas canónicas y no canónicas.

(ii) Un escenario alternativo implicaría la aparición de las permutaciones en el subdominio de palma se produjo de forma independiente en dos linajes distintos de virus dsARN (Birnavirus) y ssARN (Tetravirus).

A pesar de la igualdad de posibilidades de ambos escenarios, otros estudios estructurales convertirían a la primera de las alternativas en la más viable. Las investigaciones sobre la proteína de la cápsida de los Birnavirus revelan la existencia de una elevada similitudes entre dominios de esta proteína y su homóloga en los miembros de la antigua familia *Tetraviridae* (Coulibaly y col. 2005; Luque y col. 2007). Las similitudes estructurales descritas se ve acompañada por significativas homologías funcionales. Así, la maduración de la proteína de la cápsida de Birnavirus se produce mediante un mecanismo de procesamiento autoproteolítico similar al empleado en la maduración de su homóloga de

Tetravirus (Pringle y col. 2001; Luque y col. 2007). Estas evidencias constituyen un apoyo adicional a favor de la existencia de una conexión evolutiva entre estos dos grupos de virus de dsARN y ssARN que de acuerdo a esta hipótesis compartirían un ancestro común.

"La simplicidad es la culminación de la complejidad"
(Autor desconocido)

Conclusiones

- 1 La permutación del dominio de la palma en la RpRd de TaV no afecta a la arquitectura del centro activo ni tampoco su función.
- 2 La RpRd de TaV es capaz de sintetizar *de novo* ssARN al igual que las RpRd de la familia de los Flavivirus.
- 3 El lazo $\lambda 6$ de la RpRd de TaV regula la actividad de la enzima y es el motor del mecanismo de iniciación trabajo indican que la RpRd de TaV comparte el mismo mecanismo de iniciación *de novo* que la familia de los Flavivirus (Selisko y col. 2006), donde el lazo $\lambda 6$ actúa como plataforma iniciadora de la replicación de forma análoga a los lazos de DV o HCV.
- 4 Modificación covalente y papel del motivo B de la RpRd de TaV, no registrada en otras RpRds de virus con genoma de +ssARN.
- 5 El N-terminal de la ORF1 regula la actividad y el estado de oligomerización así como su actividad, comportándose como un modulador negativo de la actividad RpRd.
- 6 La localización del ORF1 de TaV *in vivo* sucede en regiones membranosas de organelas celulares.
- 7 La caracterización estructural del extremo C-terminal en la ORF1 por microscopía electrónica muestra que el extremo C-terminal toma una posición frente al sitio activo de la enzima bloqueando la formación de un dímero. Posiblemente con una región móvil que no se puede ver en el modelo reconstruido.
- 8 La homología estructural de la RpRd de TaV con otras polimerasas de la familia Flaviviridae establece una clara relación evolutiva entre ambos linajes virales. Por otra parte la conectividad del subdominio de la palma establece una relación ancestral entre los Permutotetravirus y los Birnavirus. Por lo tanto, en base a todas las similitudes estructurales se puede establecer un vínculo entre Flavivirus, Permutotetravirus y Birnavirus bajo un hipotético escenario evolutivo.

"Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano"

Isaac Newton

Bibliografía

Bibliografía

Abrescia NG, Bandford DH, Grimes JM, Stuart DI. 2012. Structure unifies the viral universe. *Annu Rev Biochem.* 81:795-822.

Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D66:* 213-221.

Ahlquist P, Noueir AO, Lee W, Kushner D, Dye B. 2003. Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *J Virol*, **77(15)**: 8181–8186.

Ahlquist P. 2002. RNA dependent RNA polymerases, Viruses and RNA silencing. *Science*, **296**: 1270-3.

Ahlquist P. 2006. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*, **4**: 371–382.

Ambrose RL, Lander GC, Maaty WS, Bothner B, Johnson JE, Johnson KN. 2009. Drosophila A virus is an unusual RNA virus with a T=3 icosahedral core and permuted RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, **90(9)**: 191-200.

Arnold JJ, Ghosh SK, Cameron CE. 1999. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase 3D(pol). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J Biol Chem*, **274**: 37060-37069.

Arnold JJ, Gohara DW, Cameron CE. 2004. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): pre-steady-state kinetic analysis of ribonucleotide incorporation in the presence of Mn²⁺. *Biochemistry*, **43**: 5138-5148.

Astbury WT. A discussion on the structure of proteins, Introduction. 1953. *Proc R Soc Lond Biol Sci*, **141(902)**: 1-9.

Baltimore D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, **35(3)**: 235-241.

Beerens N, Selisko B, Ricagno S, Imbert I, van der Zanden L, Snijder EJ, Canard B. 2007. De Novo Initiation of RNA Synthesis by the Arterivirus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol*, **81(16)**: 8384.

Brautigam CA, Steitz TA. 1998. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol.* **8(1)**: 54-63.

Bressanelli S, Tomei L, Rey FA, De Francesco R. 2002. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol.* **76(7)**: 3482-92.

Brierley I, Pennell S, Gilbert R. 2007. Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication. *Nature Reviews.* **5(8)**: 598-610.

- Bruenn JA.** 2003. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*. **31(7)**: 1821-1829.
- Bruenna JA.** 2003. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **31(7)**: 1821–1829.
- Castro C, Smidansky ED, Arnold JJ, Maksimchuk KR, Moustafa I, Akira Uchida, Gottö M, Konigsberg W, Cameron CE.** 2009. Nucleic acid polymerases employ a general acid for nucleotidyl transfer. *Nat Struct Mol Biol*, **16(2)**: 212–218.
- Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC.** 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.* **D66**: 16-21.
- Choi KH, Groarke JM, Young DC, Kuhn RJ, Smith JL, Pevear DC, Rossmann MG.** 2004. The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc Nat Acad Scie*, **101(13)**: 4425-4430.
- Choi KH, Rossmann MG.** 2009. RNA-dependent RNA polymerases from Flaviviridae. *Curr Opin Struct Biol*, **19(6)**: 746-51.
- Coulibaly F, Chavalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B, Rey FA.** 2005. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, **120(6)**: 761-72.
- Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D, Argos P.** 1990. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*, **3(6)**: 461-7.
- Denison MR.** 2008. Seeking Membranes: Positive-Strand RNA Virus Replication Complexes. *PLoS Biol*, **6(10)**: e270.
- Donnelly ML, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, Dam E, Gani D, Ryan MD.** 2001. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol*, **82**: 1027-1041.
- Dye BT, Miller DJ, Ahlquist P.** 2005. In vivo self-interaction of nodavirus RNA replicase protein A revealed by fluorescence energy transfer. *J. Virol.* **79**: 8909-8919
- Eden JS, Sharpe LJ, White PA, Brown AJ.** 2011. Norovirus RNA-Dependent RNA Polymerase Is Phosphorylated by an Important Survival Kinase, Akt. *J Virol*, **85(20)**: 10894-10898.
- Entwistle PF.** 1978. Virus diseases of limacodidae. In slug an Nettle Caterpillars: The biology, taxonomy and Control of the Limacodidae of Economic Importance on Palms in South East Asia. 1st Edition. Pp 213-221. Edited by M. Cock, H. Godfray & J Holloway. Walling-ford: CAB International.
- Ferrer-Orta C, Agudo R, Domingo E, Verdaguer N.** 2009. Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Struct Biol.* **19(6)**:752-8.

- Ferrer-Orta C, Arias A, Agudo R, Pérez-Luque R, Escarmís C, Domingo E, Verdaguer N.** 2006. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replicatio. *EMBO J*, **25(4)**: 880-8.
- Ferrer-Orta C, Arias A, Escarmís C, Verdaguer N.** 2006. A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, **16(1)**: 27-34.
- Ferrer-Orta C, Arias A, Pérez-Luque R, Escarmís C, Domingo E, Verdaguer N.** 2007. Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**: 9463-8.
- Ferron F, Bussetta C, Dutartre H, Canard B.** 2005. The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. *BMC Bioinformatics*, **6**: 255-271.
- Garriga D, Ferrer-Orta C, Querol-Audí J, Oliva B, Verdaguer N.** 2013. Role of Motif B Loop in Allosteric Regulation of RNA-Dependent RNA Polymerization Activity. *J Mol Biol*. In Press.
- Gohara DW, Crotty S, Arnold JJ, Yoder JD, Andino R, Cameron CE.** 2000. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): structural, biochemical, and biological analysis of con- served structural motifs A and B. *J. Biol. Chem*, **275**: 25523 - 25532.
- Gong P, Kortus MG, Nix JC, Davis RE, Peersen OB.** 2013. Structures of coxsackievirus, rhinovirus, and poliovirus polymerase elongation complexes solved by engineering RNA mediated crystal contacts. *PLoS One*. **8(5)**: e60272.
- Gong P, Peersen OB.** 2010. Structural basis for active site closure by the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107(52)**: 22505-10.
- Goodfellow I.** 2001. The genome-linked protein VPg of the vertebrate viruses, a multifaceted protein. *Curr Opin Virol*. **1(5)**: 355-62.
- Gorbalenya AE, Pringle FM, Zeddarn ZL, Luck BT, Cameron CE, Kalkmakoff, J, Hanzlik TN, Gordon KH, Ward VK.** 2002. The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA- dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol*, **324**: 47-62.
- Guo YX, Chan SW, Kwang J.** 2004. Membrane association of greasy grouper nervous necrosis virus protein A and characterization of its mitochondrial localization targeting signal. *J Virol*, **78(12)**: 6498-508.
- Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz SC.** 2001. Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J*. **20(5)**:1153-63.
- Högbom M, Jäger K, Robel I, Unge T, Rohayem J.** 2009. The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J Gen Virol*, **90**: 281-291.
- Jakubiec A, Tournier V, Drugeon G, Pflieger S, Camborde L, Vinh J, Héricourt F, Redeker V, Jupin I.** 2006. Phosphorylation of Viral RNA-dependent RNA Polymerase and Its Role in Replication of a Plus-strand RNA Virus. *J Biol Chem*, **281**: 21236-21249.

- Kaariainen L, Ahola T.** 2002. Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**:187–222.
- Kamer G, Argos P.** 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res*, **12**:7269–7282.
- Kapadia SB, Chisari FV.** 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. . *Proc Natl Acad Sci*, **102 (7)**: 2561-2566.
- Kato T, Murata T, Usui T, Park E.** 2003. Improvement of GFPuv-Beta3GnT2 Fusion Protein Production by suppressing Protease baculovirus Expression system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67 (11)**: 2388-2395.
- Kim SJ, Kim JH, Sun JM, Kim MG, Oh JW.** 2009. Suppression of hepatitis C virus replication by protein kinase C-related kinase 2 inhibitors that block phosphorylation of viral RNA polymerase. *J Viral Hepatitis*, **16 (10)**: 1365-2893.
- Koch U, Narjes F.** 2006. Allosteric inhibition of the hepatitis C virus NS5B RNA dependent RNA polymerase. *Infect Disord Drug Targets*, **6(1)**: 31-41.
- Koonin E.** 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*, **72**: 2197-2206.
- Krissinel E, Henrick K.** 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**: 774-797.
- Lee WM, Ahlquist P.** 2003. Membrane synthesis, specific lipid requirements, and localized lipid composition changes associated with a positive-strand RNA virus RNA replication protein. *J Virol*, **77(23)**: 12819-28.
- Leigh Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko R, Sykes B, Wishart DS.** 2003. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* **31(13)**: 3316-3319.
- Letzel T, Mundt E, Gorbalenya AE.** 2007. Evidence for functional significance of the permuted C motif in Co²⁺ stimulated RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, **88(10)**: 2824-33.
- Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R.** 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* **71**: 8416-28.
- Mackenzie J.** 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic*, **6**: 967–977.
- Mahias K, Ahmed-El-Sayed N, Masante C, Bitard J, Staedel C, Darfeuille F, Ventura M, Astier-Gin T.** 2010. Identification of a structural element of the hepatitis C virus minus strand RNA involved in the initiation of RNA synthesis. *Nucl Acids Res*, **38(12)**: 4079-4091.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, M. D. Winn PD, Storoni LC, Read RJ.** 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst*, **40**: 658-674.
- Miller DJ, Schwartz MD, Ahlquist P.** 2001. Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells. *J. Virol.* **75**:11664–11676.

- Miller S, Krijnse-Locker J.** 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol*, **6**: 363–374.
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.** 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, **9(9)**:1089-97.
- Moustafa IM, Shen H, Morton B, Colina CM, Cameron CE.** 2011. Molecular dynamics simulations of viral RNA polymerases link conserved and correlated motions of functional elements to fidelity. *J Mol Biol*. **410**: 159–181.
- Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn M D, Long F, Vagin AA.** 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst*. **D67**: 355-367.
- Niyomrattanakit P, Chen YL, Dong H, Yin Z, Qing M, Glickman JF, Lin K, Mueller D, Voshol H, Lim JYH, Nilar S, Keller TH, Shi PY.** 2010. Inhibition of Dengue Virus Polymerase by Blocking of the RNA Tunnel. *J Virol*, **84(11)**: 5678-86.
- Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C.** 2005. Virus factories: Associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell*, **97**: 147–172.
- Ollis DL, Brick P, Hamlin R, Xuong NG, Steitz TA.** 1985. Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTNP. *Nature*. **313**: 762-766.
- Olson A, Rosenblum E, Kuchta R.** 2010. Regulation of Influenza RNA Polymerase Activity and the Switch between Replication and Transcription by the Concentrations of the vRNA 5' End, the Cap Source, and of the Polymerase. *Biochemistry*, **49(47)**: 10208–10215.
- Osborn MJ, Panoskaltsis-Mortari A, McElmurry RT, Bell SK, Vignali DA, Ryan MD, Wilber AC, McIvor RS, Tolar J, Blazar BR.** 2005. A picornaviral '2A-like' sequence based tricistronic vector allowing for high level therapeutic gene expression coupled to a dual reporter system. *Mol. Ther*. **12**: 569–574.
- Pan J, Lin L, Tao YJ.** 2009. Self-guanylylation of birnavirus VP1 does not require an intact polymerase activity site. *Virology*, **395(1)**: 87-96.
- Paul AV.** 2002. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. *Molecular Biology of Picornaviruses* (Semler BL, Wimmer E eds): 227-246 Washington, DC: ASM Press.
- Petrek M, Kosinova P, Koca J, Otyepka M.** 2007. MOLE: A Voronoi Diagram-Based Explorer of Molecular Channels, Pores, and Tunnels. *Structure*, **15**: 1357-1363
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE.** 2004. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. **25(13)**:1605-12.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N.** 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, **8**: 3869-3874.

- Poranen MM, Salgado PS, Koivunen MR, Wright S, Bamford DH, Stuart D, Grimes JM.** 2008. Structural explanation for the role of Mn^{2+} in the activity of 6 RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **36**: 6633–6644.
- Restrepo-Hartwig MA, Ahlquist P.** 1996. Brome mosaic virus heli- case- and polymerase-like proteins colocalize on the endoplasmic reticulum at sites of viral RNA synthesis. *J. Virol.* **70**: 8908–8916.
- Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE.** 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*, **73**: 2129-2134.
- Rust RC, Landmann L, Gosert R, Tang BL, Hong W, Hauri HP, Egger D, Bienz K.** 2001. Cellular COPII proteins are involved in produc- tion of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J. Virol.* **75**: 9808–9818.
- Ryan MD, King AM, Thomas GP.** 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol*, **72**: 2727-2732.
- Sankar S. Porter AG.** 1992. Point mutations which drastically affect the polymerization activity of encephalomyocarditis virus RNA-dependent RNA polymerase correspond to the active site of Escherichia coli DNA polymerase I. *J Biol Chem*, **267**: 10168-76.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9**: 671-5.
- Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P.** 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol. Cell.* **9**: 505–514.
- Schwed PS, Dobos P, Cameron LA, Vakharia VN, Duncan R.** 2002. Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology*, **296 (2)**: 241-50.
- Stapleford KA, Miller DJ.** 2010. Role of Cellular Lipids in Positive-Sense RNA Virus Replication Complex Assembly and Function. *Viruses*, **2 (5)**: 1055-1068.
- Steitz TA.** 1993. DNA- and RNA-dependent DNA polymerasesA mechanism for all polymerases. *Current Opinion in Struct Biol.* **3(1)**: 31-38.
- Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA.** 2004. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.* **22**: 589–594.
- Tripcone D.** 1970. Studies on a nonoccluded virus of the pine tree emperor moth. *Journal of Invertebrate Pathology.* **15(2)**: 268-275.
- van der Heijden MW, Bol JF.** 2002. Composition of alphavirus-like replication complexes: involvement of virus and host encoded proteins. *Arch Virol*, **147**: 875–898.
- van Dijk AA, Frilander M, Bamford DH.** 1995. Differentiation between minus- and plus-strand synthesis: polymerase activity of dsRNA bacteriophage phi 6 in an in vitro packaging and replication system. *Virology*, **211**: 320-323.

- van Dijk AA, Makeyev EV, Bamford DH.** 2004. Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. Review. *J Gen Virol*, **85**: 1077–1093.
- Verdaguer N, Ferrer-Orta C.** 2012. Conformational Changes in Motif D of RdRPs as Fidelity Determinant. *Structure*, **20**: 1448-9.
- von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, Behrens SE, Letzel T, Mundt E.** 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, **85**: 2221-2229.
- Ward G, Stover K, Moss B, Fuerst T.** 1995. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 6773-6777.
- Ward GA, Stover CK, Moss B y Fuerst TR.** 1995. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 6773-7.
- Wen G, Xue J, Shen Y, Zhang C, Pan Z.** 2009. Characterization of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity and its modulation by CSFV RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Research*, **141**: 63-70.
- Wright S, Poranen MM, Bamford DH, Stuart DI, Grimes JM.** 2012. Non-catalytic ions direct the RNA-dependent RNA polymerase of bacterial dsRNA virus 6 from De Novo initiation to elongation. *J Virol*, **86**: 2837–2849.
- Wu SX, Ahlquist A, Kaesber P.** 1992. Active complete in vitro replication of nodavirus RNA requires glycerphospholipid. *Proc Natl Acad Sci*, **89**: 11136-11140.
- Yamada K, Nakajima Y, Natori S.** 1990. Production of recombinant sarcotoxin IA in *Bombix mori* cells. *Biochem. J.* **272**: 633-636.
- Yang X, Smidansky ED, Maksimchuk KR, Lum D, Welch JL, Arnold JJ, Cameron CE, Boehr DD.** 2012. Motif D of viral RNA-dependent RNA polymerases determines efficiency and fidelity of nucleotide addition. *Structure*, **20(9)**: 1519–27.
- Yap LT, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J.** 2007. Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85 Angstrom Resolution. *J Virol*, **81(9)**: 4753-4765.